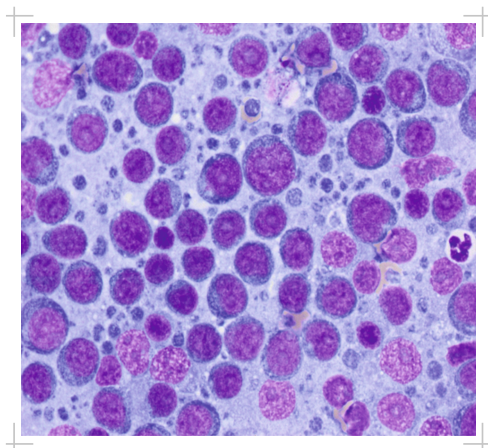


ESTHER LAUTSCHAM

Das canine multizentrische maligne Lymphom:
Untersuchungen zur Epidemiologie in Deutschland
und Vergleich zweier Chemotherapieprotokolle
mit und ohne Erhaltungsphase



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin -
Klinik für Kleintiere - Innere Medizin

Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: PD. Dr. Natali Bauer

**Das canine multizentrische maligne Lymphom:
Untersuchungen zur Epidemiologie in Deutschland
und Vergleich zweier Chemotherapieprotokolle**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität
Gießen

eingereicht von

Esther Lautscham

Tierärztin aus Saarwellingen

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-
Liebig-Universität Gießen

Dekan: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: PD Dr. Natali Bauer
Prof. Dr. Reto Neiger
Prof. Dr. Christiane Herden

Tag der Disputation: 13.12.2017

Meiner Familie

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	4
II	Abbildungs-und Tabellenverzeichnis	5
III	Abkürzungsverzeichnis.....	6
1	Einleitung.....	8
2	Literaturübersicht.....	10
2.1	Das canine maligne Lymphom	10
2.1.1	Terminologie.....	10
2.1.2	Epidemiologie.....	10
2.1.3	Diagnosestellung.....	12
2.1.4	Klassifikation	13
2.1.5	Staging – klinische Stadieneinteilung	15
2.1.6	Immunphänotypisierung.....	16
2.2	Therapie des multizentrischen malignen Lymphoms	16
2.2.1	Eingesetzte Chemotherapeutika	17
2.2.2	Chemotherapieprotokolle.....	22
2.2.3	Handhabung und Entsorgung von Chemotherapeutika	26
2.2.4	Rezidivbehandlung	29
2.2.5	Mechanismen der Resistenzbildung beim malignen Lymphom.....	29
2.3	Prognostische Faktoren	30
2.3.1	Vorbehandlung mit Kortikosteroiden.....	30
2.3.2	Stadium und Substadium	30
2.3.3	Immunphänotyp (B- und T-Zell).....	31
2.3.4	Geschlecht und Alter.....	32
2.3.5	Hyperkalzämie	32
2.3.6	Weitere prognostische Faktoren.....	33
2.4	Ziel und Hypothese	34
3	Eigene Arbeiten	36
3.1	Publikation 1.....	37
3.2	Publikation 2.....	44
4	Diskussion.....	45
5	Zusammenfassung.....	60
6	Extended Summary	63
7	Literaturverzeichnis.....	66
8	Danksagung	84
9	Erklärung.....	85

II Abbildungs-und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Stadieneinteilung der WHO für das multizentrische maligne Lymphom des Hundes (Owen, 1980)	13
Tabelle 2:	Überblick über verschiedene CHOP-Protokolle zur Behandlung des caninen multizentrischen Lymphoms	16
Abbildung 1:	Zellzyklusphasen	20
Abbildung 2:	Gekennzeichneter Raum zur Aufbewahrung von Zytostatika	25
Abbildung 3:	Sicherheitswerkbank zur Zubereitung der Zytostatika	26
Abbildung 4:	BD Pha-Seal®-System und Applizierhilfe mit Luer Lock Spritze	26

III Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
CD	Cluster of differentiation
CHOP-LAsp	Chemotherapieprotokoll bestehend aus: C = cyclophosphamid- Endoxan, H = hydroxydaunorobin - Doxorubicin, O = Oncovin® - Vincristin, P = Prednisolon, LAsp = L-Asparaginase: Asparaginase
COP	Chemotherapieprotokoll bestehend aus: C = cyclophosphamide, O = Oncovin® - Vincristin, P = Prednisolon
CR	Komplettremission
DFR	erste Remissionszeitspanne (Duration of first Remission)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
I	Induktionsprotokoll
i.v.	intravenös
i.m.	intramuskulär
IU	internationale Einheiten
kg	Kilogramm
KOF	Körperoberfläche
M	Erhaltungsprotokoll
MC	multi center Studie
MDR	multi-drug resistance
MRP	multidrug-resistance related protein
mg	Milligramm
m ²	Quadratmeter
n	Anzahl
NR	keine Remission
P=/ α	Irrtumswahrscheinlichkeit
P	prospektiv
P-gp	Permeability glycoprotein
p.o.	per Os
PR	partielle Remission

PTH-rp	Parathormon-related Protein
R	retrospektiv
RNA	Ribonukleinsäure
SC	single center Studie
SPSS	Statistical Packages for the Social Sciences
ST	Gesamtüberlebenszeit (Survival Time)
WHO	World Health Organization
>	größer als
<	kleiner als

1 Einleitung

Das maligne Lymphom gehört zur Gruppe der hämatopoetischen Tumoren (Tumoren der Blutzellen). Es ist eine systemische Tumorerkrankung, die von jugendlichen oder reifzelligen lymphatischen Zellen ausgeht und mit dem "Non-Hodgkin-Lymphom" des Menschen vergleichbar ist (Teske 1994a). Das Lymphom gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen beim Hund, wobei das multizentrische Lymphom ca. 84 % der Fälle ausmacht und damit die häufigste Form darstellt (Madewell und Theilen, 1987).

Das maligne Lymphom zählt zu den am besten behandelbaren malignen Tumorerkrankungen des Hundes. Die Chemotherapie stellt, aufgrund des systemischen Charakters der Erkrankung, die Therapie der Wahl dar. In der Literatur werden zahlreiche Chemotherapieprotokolle beschrieben, wobei das CHOP-L-Asp Protokoll aufgrund seiner Effektivität am häufigsten angewendet wird (Keller et al 1993; Zemmann et al. 1998; Moore et al. 2001; Simon et al. 2010). Eine Literaturübersicht zeigt allerdings sehr schnell, dass trotz der Erkrankungshäufigkeit die Patientenzahlen der verschiedenen Studien relativ klein sind (n = 24-130). So basiert die größte deutsche Untersuchung als Multicenter Studie auf 114 Patienten (Simon et al., 2008). Die Aussage, Chemotherapieprotokolle ohne Erhaltungsphase ergäben vergleichbare Überlebenszeiten wie solche mit Erhaltungsphase, basiert dementsprechend ebenfalls auf verhältnismäßig kleinen Fallzahlen, die als Multicenter Studien, in unterschiedlichen Institutionen und von unterschiedlichen Klinikern den eindeutigen Vergleich nicht zulassen.

Ziel dieser retrospektiven Studie waren die Überprüfung und der Vergleich des gleichen CHOP-L-Asp Protokolls mit und ohne Erhaltungsphase an einem weit größeren Patientengut als bisher beschrieben von über 400 Fällen. Dabei wurden alle Patienten in derselben Institution, von denselben Onkologen und unter gleichen Bedingungen behandelt.

Gleichzeitig wurde anhand des Datenmaterials von über 400 Fällen aus Deutschland eine epidemiologische Studie im Hinblick auf die Rasseverteilung, Alter, Geschlecht, die Prävalenz der paraneoplastischen Hyperkalzämie, sowie die Rassehäufungen im

Hinblick auf die T/B-Immunphänotypen durchgeführt. Epidemiologische Studien zum multizentrischen caninen malignen Lymphom in Deutschland wurden, nach Literaturrecherche der Autorin, bisher nicht durchgeführt. Als Bezugsgröße (Basispopulation) wurden erstmalig zwei Vergleichspopulationen (krankenversicherte Hunde und Gesamtpatientenpopulation der Tierklinik Hofheim) verwendet, um den Vergleich verschiedener häufig verwendeter Bezugspopulationen zu ermöglichen.

2 Literaturübersicht

2.1 Das canine maligne Lymphom

2.1.1 Terminologie

Thomas Hodgkin beschrieb 1832 bei sieben Menschen und 1858 erstmals beim Tier eine Erkrankung des lymphatischen Gewebes. Theodor Bilotz prägte 1871 den Begriff "malignant lymphoma", um dieses Krankheitsbild zu beschreiben.

Erik Teske zeigte, dass das maligne Lymphom beim Hund mit dem "Non-Hodgkin-Lymphom" des Menschen annähernd identisch ist (Teske 1994a). Ein "Hodgkin-Lymphom", eine andere Form der Erkrankung beim Menschen mit seinen typischen mehrkernigen Riesenzellen (Reed-Sternberg Zellen), wurde bisher bei Hund und Katze nur in Einzelfällen in der Literatur beschrieben (Maeda et al., 1993; Walton und Hendrick, 2001).

2.1.2 Epidemiologie

Das maligne Lymphom gehört zu den hämatopoietischen Tumoren und ist mit fast 85 % in dieser Gruppe deutlich überrepräsentiert (Madewell und Theilen, 1987). Die jährliche Inzidenzrate wird je nach Region, Rasse und Alter des Hundes mit 13-114/100.000 Fällen angegeben, wobei die genaue Zahl deutlich höher geschätzt wird (Bäckgren et al., 1965; Teske 1994a; Novotny, 1998; Dobson et al., 2002).

Es sind vor allem mittelalte bis alte Hunde mit einem Durchschnittsalter von 6-9 Jahren betroffen, wobei Hunde jeden Alters erkranken können (Teske et al., 1994a, b; Vail et al., 2001). Rasseprädispositionen werden für den Boxer, Scottish Terrier, Basset Hound, Airedale Terrier, Golden Retriever, Bulldoggen und den Bouvier des Flandres beschrieben (Teske et al., 1994c; Modiano et al., 2005). Studien zu familiären Häufungen sind für den Bullmastiff und Rottweiler sowie Otterhund verfügbar (Onions, 1984; Teske et al., 1994c). Genetische Einflüsse werden auf diesen Studien basierend diskutiert, allerdings ist die genaue Ursache der Erkrankung bisher nicht geklärt (Teske et al.,

1994c).

Je nach Tumorerkrankung gibt es deutliche geographische Unterschiede in der Prävalenz rassespezifischer Tumorerkrankungen, die sich z.B. durch die Verwendung merkmalttragender Zuchtrüden in den einzelnen Ländern erklären lässt. Unter anderem ist das Ziel von epidemiologischen Studien, prädisponierte Rassen und die genetischen Mutationen für mögliche erbliche Erkrankungen zu identifizieren. Neben genetischen Prädispositionen wurden bisher nur wenige äußere Einflüsse, wie länderspezifische Fütterungsgewohnheiten, Expositionen gegenüber Toxinen oder unterschiedlich vorkommende Parasiten hinsichtlich unterschiedlicher Auftretenshäufigkeit bestimmter Tumorerkrankungen in unterschiedlichen geographischen Regionen untersucht (Glickmann et al., 1989; 2004; Mazaki-Tovi et al., 2002; Marconato et al., 2009). Zur genauen Ermittlung von Rasseprädispositionen müssen Vergleichspopulationen herangezogen werden, um potentielle Verfälschungen durch häufig vertretende Rassen in der Gesamtpopulation gering zu halten. Die Wahl der Vergleichspopulation muss dabei kritisch begutachtet werden, da z.B. Klinikschwerpunkte und spezialisierte Kliniken die Rassehäufungen in einer Gesamthospitalpopulation verfälschen können. Diesbezüglich beschränken sich die aktuellen Studien zum malignen Lymphom des Hundes auf Großbritannien (Dobson et al. 2002, Edwards et al., 2003). In diesen Studien wurde die Population der versicherten Hunde als Vergleichspopulation herangezogen. Andere Studien verzichteten entweder ganz auf eine Vergleichspopulation oder verwendeten eine Gesamthospitalpopulation (Skandinavien-Bäckgren et al., 1965; USA-Dorn et al., 1967; USA-Priester, 1967; Niederlande-Teske et al., 1994c; USA-Zemann et al. 1998). Für Deutschland liegen aktuell keine Untersuchungen zur Epidemiologie des caninen malignen Lymphoms vor.

Eine Geschlechtsprädisposition besteht nicht (Teske 1994a), obwohl einige Autoren ein vermehrtes Auftreten beim männlichen (Jagielski et al., 2002) oder weiblichen Tier gesehen haben (Priester und McKay, 1980).

2.1.3 Diagnosestellung

Die Diagnosestellung des caninen malignen Lymphoms ist ein „multi-step Prozeß“ der neben anamnestischer und klinisch erhobener Befunde auch weitere Diagnostik in Form von Bildgebung, Laborparameter, Zytologie, Histologie und ergänzende Techniken, wie Durchflusszytometrie und gegebenenfalls Klonalitätsuntersuchung (PARR Methode) involviert (Comazzi und Gelain, 2011).

Die (Vor) Diagnose eines caninen malignen Lymphoms wird in den allermeisten Fällen durch eine Feinnadel(aspirations)biopsie und ihre anschließende zytologische Untersuchung gestellt (Sözmen et al., 2005; Joetzke et al., 2012). Es ist eine schnelle sowie billige Methode und birgt kaum Komplikationspotenzial (Fournel-Fleury et al., 2002). Allerdings ist eine 100%ige Diagnosestellung, sowie eine Klassifikation in die Lymphomsubtypen limitiert. Eine chirurgisch entnommene Biopsie mit anschließender histologischer Untersuchung ist der Goldstandard zur Diagnosestellung eines malignen Lymphoms (Landgren et al. 2004).

Daneben wurden weitere minimalinvasive Methoden zur Diagnosesicherung, sowie Immunphänotypisierung entwickelt. Die Durchflusszytometrie aus Lymphknotenaspiraten, peripherem Blut oder Knochenmarkaspiraten bietet eine leicht durchführbare, sowie schnelle Möglichkeit der Immunphänotypisierung zur Unterstützung der zytologisch gestellten Diagnose. Allerdings ist sie, aufgrund der hohen Erhaltungskosten, weiterhin keine Routineuntersuchung in der Veterinärmedizin (Comazzi und Gelain, 2011). Neben einer unterstützenden Sicherung der Diagnose ist auch eine Detektierung einer minimalen Resterkrankung (MRD) mit der Durchflusszytometrie, sowie der PARR-Methode möglich (Aresu et al., 2014). Die PARR-Methode (Polymerase Kettenreaktion zur Amplifikation von Antigenrezeptorgenen), ebenfalls durchgeführt aus Lymphknotenaspiraten, peripherem Blut oder Knochenmarkaspiraten, hat eine hohe Sensitivität und ist insgesamt sensitiver als die Durchflusszytometrie, da sie – im Falle einer real time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bereits eine einzelne Tumorzelle aus 10.000 Zellen detektieren und vervielfältigen kann (Aresu et al., 2014; Sato et al., 2016). Eine Kombination aus PARR und Durchflusszytometrie führt zu weiteren verbesserten Ergebnissen (Aresu et al., 2014).

2.1.4 Klassifikation

Multiple zytomorphologische, sowie anatomische Klassifizierungsschemata stehen zur Klassifikation des caninen malignen Lymphoms zur Verfügung. Nach der anatomischen Verteilung im Körper werden fünf (sechs) Formen des malignen caninen Lymphoms unterschieden (Owen, 1980):

1. multizentrisch
2. alimentär oder gastrointestinal
3. mediastinal
4. kutan
5. extranodal
6. (leukämische Form)

Das klinische Bild der **multizentrischen Form** ist durch eine generalisierte Lymphknotenvergrößerung und häufig durch eine Infiltration von Milz und Leber mit Hepato- und Splenomegalie gekennzeichnet. Im Laufe der Erkrankung kommt es zu weiteren unspezifischen Symptomen wie Apathie, Anorexie, Vomitus, Polydipsie, Dyspnoe, usw. (Squire et al., 1973; Couto 1985; Teske, 2013). Das Knochenmark kann im Verlauf der Erkrankung sekundär mitbetroffen sein (Stadium V). Seltener tritt zusätzlich eine extranodale Manifestation (z.B. Infiltration des Lungenparenchyms) auf.

Die **alimentäre oder gastrointestinale Form** macht lediglich einen Anteil von 2-7 % der Fälle aus (Couto et al., 1989; Teske, 2013), wobei zwei verschiedene Formen unterschieden werden. Es besteht eine diffuse Form, wobei die Darmwand des gesamten Magen-Darm-Traktes diffus mit Lymphomzellen infiltriert sein kann, und eine solide Form, bei der es zur Ausbildung eines makroskopisch sichtbaren Tumorknotens (häufig mehrere +/- abdominale Lymphadenopathie) in die Darmwand kommen kann. Dementsprechend präsentieren sich die gastro-intestinalen Symptome, die von Erbrechen, Diarrhoe, Hämatochezie und Gewichtsverlust bis hin zum Darmverschluss oder zur Darmperforation reichen können (Couto, 1985; Coyle und Steinberg, 2004; Teske, 2013).

Die **mediastinale Form** zeichnet sich durch eine Vergrößerung der mediastinalen

Lymphknoten und/oder des Thymus aus, wobei es zusätzlich zu einem Pleuraerguss kommen kann (Teske, 2013). Es handelt sich oftmals um T-Zell Lymphome, ursächlich hierfür ist vermutlich der Thymus, der für die T-Zell Reifung verantwortlich ist (Fan und Kitchell, 2002). T-Zell Lymphome gehen oft mit einer paraneoplastischen Hyperkalzämie einher, die unter anderem durch die tumoreigene Produktion einer Parathormon-ähnlichen Substanz hervorgerufen wird (Kubota et al., 2002). Dementsprechend geht diese Lymphomform in bis zu 40 % der Fälle mit einer Hyperkalzämie einher (Teske, 2013). Symptome wie Polyurie, Polydipsie, Inappetenz, Schwäche, Husten und Dyspnoe sind daher möglich. Selten wird ein Vena-cava Syndrom beobachtet.

Das **kutane Lymphom** unterteilt sich in epitheliotrope und nicht-epitheliotrope Formen: die häufiger auftretenden epitheliotropen (meist T-Zell) Formen entstehen aus den intraepithelialen lymphatischen Zellen, während die nicht-epitheliotropen Formen (meist T-Zell) selten primär, sondern meist sekundär als Manifestation eines z.B. multizentrischen Lymphoms auftreten. Das klinische Bild der epitheliotropen Form präsentiert sich als ein generalisiertes oder multifokales Auftreten in Form von Schuppen, Knötchen, Plaques, Ulzera, Hautrötungen oder als exfoliative Dermatitis. Darüber hinaus sieht man häufig auch eine Beteiligung der Maul-, Nasen-, Rektum- oder Präputial-/Vulvaschleimhaut (Vail et al., 2001).

Bei den beim Hund seltenen **extranodalen Lymphomen** ist das klinische Bild und die Symptomatik von dem betroffenen Organ (Augen, Nervensystem, Nieren, Nasenhöhle, ...) abhängig (Teske, 2013). Dementsprechend geht die okuläre Form mit einer Verdickung der Iris, Hypopyon und Glaukom (Swanson, 1990; Massa et al., 2002, Teske, 2013) und die nervale Form je nach Lokalisation mit neurologischen Störungen, wie epileptischen Anfällen, Paralysen oder Paresen einher (Teske, 2013).

Die **leukämische Form** wird mit alleiniger Infiltration des Knochenmarks und peripheren Bluts beschrieben, wobei diese Form nur schwer von einer "echten" Leukämie zu unterscheiden ist (Vail et al., 2001; Teske, 2013).

Als zytomorphologische Klassifizierungsschemata werden in der Tiermedizin vor allem

die Working Formulation des National Cancer Instituts (NCI) sowie die KIEL-/REAL-Klassifikation verwendet. Die histologische Einteilung beruht dabei auf zwei Kriterien: dem Wachstumsmuster und der Morphologie der neoplastischen Zelle (Teske et al., 1994a, d; Link et al., 1997; Ponce et al., 2004). Je nach Klassifizierungsschemata werden Lymphome vom niedrigen, mittleren und hohen Malignitätsgrad unterschieden, wobei Hunde nach der Working Formulation vor allem mit intermediär und hochmalignen und nach der KIEL-Klassifikation mit hochmalignen Formen vorgestellt werden (Carter et al., 1986; Greenlee et al., 1990; Teske et al., 1994d; Sözmen et al., 2005; De Arespacochaga et al., 2007). Die aktuellste WHO Einteilung beruht auf der REAL-Klassifikation (Swerdlow et al., 2008).

2.1.5 Staging – klinische Stadieneinteilung

Nach unten stehender Tabelle wird die multizentrische Form des malignen Lymphoms beim Hund in Stadien und Substadien eingeteilt, um das Ausmaß der Erkrankung besser erfassen zu können. Die Tiere werden dabei vor allem in den Stadien III und IV vorgestellt.

Tabelle 1: Stadieneinteilung der WHO für das multizentrische maligne Lymphom des Hundes (Owen 1980):

Stadium 1	ein Lymphknoten oder lymphatisches Gewebe eines Organs (außer Knochenmark)
Stadium 2	mehrere Lymphknoten einer Region betroffen (+/- Tonsillen)
Stadium 3	generalisierte Lymphknotenvergrößerung
Stadium 4	Leber oder Milz betroffen (+/- Stadium 3)
Stadium 5	Blut und Knochenmark und/oder andere Organsysteme betroffen (+/- Stadium 1-4)

Substadium a	ohne klinische Anzeichen einer Erkrankung
Substadium b	mit klinischen Anzeichen einer Erkrankung

2.1.6 Immunphänotypisierung

Die Immunphänotypisierung wird aus formalinfixierten histologischen Gewebeproben aus einem betroffenen Lymphknoten durchgeführt und dient zur Differenzierung der B- und T-Zell Lymphome mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (Culmsee et al., 2001). Die meisten caninen multizentrischen Lymphome konnten als B-Zell Lymphome diagnostiziert werden (Greenlee et al., 1990; De Arespachaga et al., 2007). T-Zell Lymphome kommen bei einzelnen Rassen vermehrt vor (Modiano et al., 2005) und haben je nach Studie an den multizentrischen Lymphomen einen Anteil von 10-38 % (Teske et al., 1994a, d; Ruslander et al., 1997, Sözmén et al., 2005).

2.2 Therapie des multizentrischen malignen Lymphoms

Aufgrund des systemischen Charakters des caninen multizentrischen malignen Lymphoms ist eine Chemotherapie die Therapie der Wahl.

Überlebenszeiten ohne jegliche Therapie werden mit ein bis drei Monaten angegeben (Squire et al., 1973). Eine reine medikamentöse Therapie mit Glukokortikoiden führte zwar in 17-43 % der Fälle anfänglich zur Komplettremission, die medianen Überlebenszeiten werden allerdings ebenfalls mit ein bis drei Monaten angegeben (Squire et al., 1973; Bell et al., 1984), bedingt durch eine frühe Resistenzbildung (siehe 2.3.1).

Neben der Chemotherapie wurden weitere Therapieoptionen untersucht. Die Chirurgie hat dabei eine deutlich untergeordnete Rolle. Lediglich bei einem multizentrischen Lymphom Stadium I oder II kann eine Operation erwogen werden. Desweiteren wird zusätzlich eine Splenektomie diskutiert, um eine schnelle massive Zellreduktion zu erreichen, wobei unterschiedliche Resultate veröffentlicht wurden (Squire et al., 1973).

Lymphomzellen gelten insgesamt als sehr strahlensensibel, wobei die Indikation aufgrund des systemischen Charakters der Erkrankung eingeschränkt ist. In einer älteren Studie wurde bei 14 Hunden mit multizentrischem Lymphom eine Ganzkörperbestrahlung durchgeführt, bei lediglich 4 Hunden kam es zur kompletten und bei 3 zur partiellen Remission, wobei die medianen Überlebenszeiten lediglich bei 13 bzw. 3 Wochen lagen (Johnson et al., 1969). Bessere Resultate zeigte die Studie von Lurie, bei der ein Polychemotherapieprotokoll mit einer sequentiellen Halbkörperbestrahlung im Abstand von 2 Wochen kombiniert wurde. Mediane Überlebenszeiten von 684 Tagen wurden beschrieben (Lurie et al. 2009). Untersuchungen zu kombinierten Therapien aus Strahlentherapie und Transplantationen autologen Knochenmarks erbrachten ebenfalls bessere Resultate und bei ca. 25% eine Heilung der Erkrankung (Deeg et al., 1985; Appelbaum et al., 1986). Aufgrund von massiven Kosten wurde diese Therapieoption allerdings kaum angewandt und ist in der Veterinärmedizin nicht umsetzbar.

Untersuchungen zur Immuntherapie alleine oder in Kombination mit einer Chemotherapie wurden ebenfalls durchgeführt. Jeglum et al. konnten keine verbesserten Überlebenszeiten bei Hunden, die nur mit einer Chemotherapie gegenüber Hunden die mit einer Chemotherapie kombiniert mit einer intralymphatischen Tumorzellvakzine behandelt wurden, feststellen (Jeglum et al., 1988). Sorenmo et al. untersuchten eine Tumorzellvakzine aus autologen CD40 aktivierten B-Zellen. Sie zeigte keine verbesserten Überlebenszeiten im Vergleich zu einer Chemotherapie alleine; allerdings wurden verbesserte zweite Remissionsraten gesehen (Sorenmo et al., 2011).

2.2.1 Eingesetzte Chemotherapeutika

Im folgenden Abschnitt werden die zum Einsatz kommenden Chemotherapeutika zur Behandlung des caninen malignen Lymphoms, im Hinblick auf ihren Wirkungsmechanismus und ihre Prinzipien, näher beleuchtet. Die Chemotherapeutika werden dabei in „Phasen-spezifische“, „Zellzyklus-abhängige“ und „Zellzyklus-unabhängige Chemotherapeutika“ unterteilt (Hirschberger, 2013). Die Phasen des

Zellzyklus der tumorösen Zelle unterscheiden sich dabei nicht von der gesunden Zelle (siehe Abb. 1) und werden in Interphase - Phasen G1, S, G2 und Mitose, und eine Ruhephase – Phase G0 eingeteilt (siehe Abb. 1).

Die Vinca Alcaloide sind phasenspezifische Chemotherapeutika und wirken in der M-Phase (Mitose) als Mitosehemmer. Die Zellteilung wird durch Hemmung der Ausbildung von Mikrotubuli durch Bindung an das Protein Tubulin blockiert. Sie werden in der Leber metabolisiert und mit dem Kot ausgeschieden; daher ist der Einsatz bei Leberfunktionsstörungen kritisch anzusehen. Gastrointestinale Nebenwirkungen, wie Anorexie, Vomitus und Konstipation, sowie periphere Neuropathien werden beschrieben. Gewebereizungen bis hin zur Gewebenekrose treten nach extravasaler Verabreichung, wie bei allen intravenös zu applizierenden Chemotherapeutika auf. **Vincristin** und **Vinblastin** sind die in der Veterinärmedizin bei einem caninen malignen Lymphom zum Einsatz kommenden Substanzen. Vincristin ist in einer Dosierung von 0,5-0,7mg/m² und Vinblastin in einer Dosierung von 2mg/m² Körperoberfläche (KOF) einzusetzen. Beide Chemotherapeutika sollten streng intravenös angewandt werden (Rosenthal, 1981; Simon et al., 2006; 2008).

Alkylanzien sind Zellzyklus-unabhängige Chemotherapeutika und stellen eine große heterogene Gruppe von Chemotherapeutika dar. Ihre Wirkung beruht auf einer Hemmung der DNA-Replikation und RNA-Transkription durch kovalente Bindung einer Alkylgruppe auf die DNA, allerdings benötigen sie eine Aktivierung in aktive Metaboliten durch das Oxidasesystem der Leber. Die hauptsächlich eingesetzten Chemotherapeutika aus dieser Gruppe sind Cyclophosphamid, Chlorambucil und Lomustin, sowie Dacarbazin und Mechlorethamin. **Cyclophosphamid** kann intravenös oder oral verabreicht werden. Die Dosis beträgt 200-250mg/m². Häufig auftretende Nebenwirkungen sind die sterile hämorrhagische Zystitis, Myelosuppression und vereinzelt gastrointestinale Toxizität. Bei Vorbelastung des unteren Harntraktes sowie der Nieren muss ein Einsatz überdacht werden (MacEwen et al., 1987; Price et al., 1991; Myers et al., 1997; Simon et al., 2008). **Chlorambucil** wird beim multizentrischen Lymphom des Hundes vor allem als Ersatzmedikament für Cyclophosphamid bei Auftreten von stärkeren Nebenwirkungen eingesetzt. Es wird oral verabreicht. Die Dosierungen sind sehr variabel und sollten sich nach der Zahl neutrophiler

Granulozyten richten. Dosierungen von $15\text{mg}/\text{m}^2$ KOF an 4 aufeinander folgenden Tagen alle 3 Wochen bis hin zu $35\text{mg}/\text{m}^2$ KOF einmalig werden beschrieben (Boyce et al., 2000; Hirschberger, 2013). **Lomustin** wird ebenfalls oral verabreicht. Beschriebene Nebenwirkungen sind vor allem Leberwerterhöhungen bis hin zum Leberversagen, Thrombozytopenie bis hin zu hgr. Koagulopathien, sowie Myelosuppression mit einem späten Nadir von 7-14-21 Tagen. Es wird in einer Dosierung von $60\text{-}90\text{mg}/\text{m}^2$ KOF eingesetzt (Moore et al., 1999; Saba et al., 2007). **Dacarbazin** ist ein nicht klassisches Alkylanz und zeigt einen anderen Wirkungsmechanismus, indem es nach seiner Aktivierung eine direkte Schädigung der DNA durchführt. Es treten vor allem Myelosuppressionen und gastrointestinale Nebenwirkungen in Form von Erbrechen auf, sodass prophylaktisch Antiemetika eingesetzt werden sollten. Dacarbazin wird intravenös verabreicht, die Dosis beträgt $200\text{mg}/\text{m}^2$ KOF einmal täglich über fünf Tage oder $800\text{-}1000\text{mg}/\text{m}^2$ KOF alle 3 Wochen (Van Vechten et al., 1990; Flory et al., 2008). **Mechlorethamin** ist ein Bestandteil des sogenannten MOPP Protokolls (siehe Kapitel 2.2.2) und wird hauptsächlich im Fall eines Lymphom Rezidivs als sogenannte Rescue-Therapie eingesetzt. Es ist zur Zeit nicht in Deutschland zugelassen, sodass es kaum Anwendung findet. Myelosuppression und gastrointestinale Nebenwirkungen werden beschrieben. Es wird intravenös verabreicht. Die Dosis beträgt $3\text{mg}/\text{m}^2$ KOF (Rassnick et al., 2002; Brodsky et al., 2009).

Die Platinderivate sind ebenfalls Zellzyklus-unabhängige Chemotherapeutika, sie wirken aber am besten in der Synthesephase. Ihr Wirkmechanismus ähnelt dem der Alkylanzien, indem durch kovalente Bindungen mit der DNA Quervernetzungen zwischen den DNA-Strängen ausgebildet werden, die zur Blockade der DNA-Replikation führen, daneben führen sie zu Punktmutationen und Hemmung der DNA-Reparaturmechanismen, was eine Apoptose zur Folge hat. **Cisplatin** und **Carboplatin** sind die zum Einsatz kommenden Chemotherapeutika. Cisplatin hat eine ausgeprägte Nephrotoxizität, sowie Myelosuppression oftmals verbunden mit einem zweimaligen Nadir am 7. und 19. Tag nach Applikation. Eine weitere Nebenwirkung ist Erbrechen, wodurch eine prophylaktische Gabe eines Antiemetikums notwendig wird. Bei Vorbelastung der Niere sollte Cisplatin, aufgrund seiner Nephrotoxizität, nicht eingesetzt werden. Carboplatin hat dadurch Cisplatin weitestgehend aus der klinischen

Anwendung abgelöst. Carboplatin ist nicht so nephrotoxisch, zeigt ansonsten aber die gleichen Nebenwirkungen wie Cisplatin. Beide Chemotherapeutika werden intravenös verabreicht. Die Dosierung von Cisplatin beträgt 60-70mg/m² KOF und von Carboplatin 250-300mg/m² KOF (Page et al., 1993; Hirschberger, 2013).

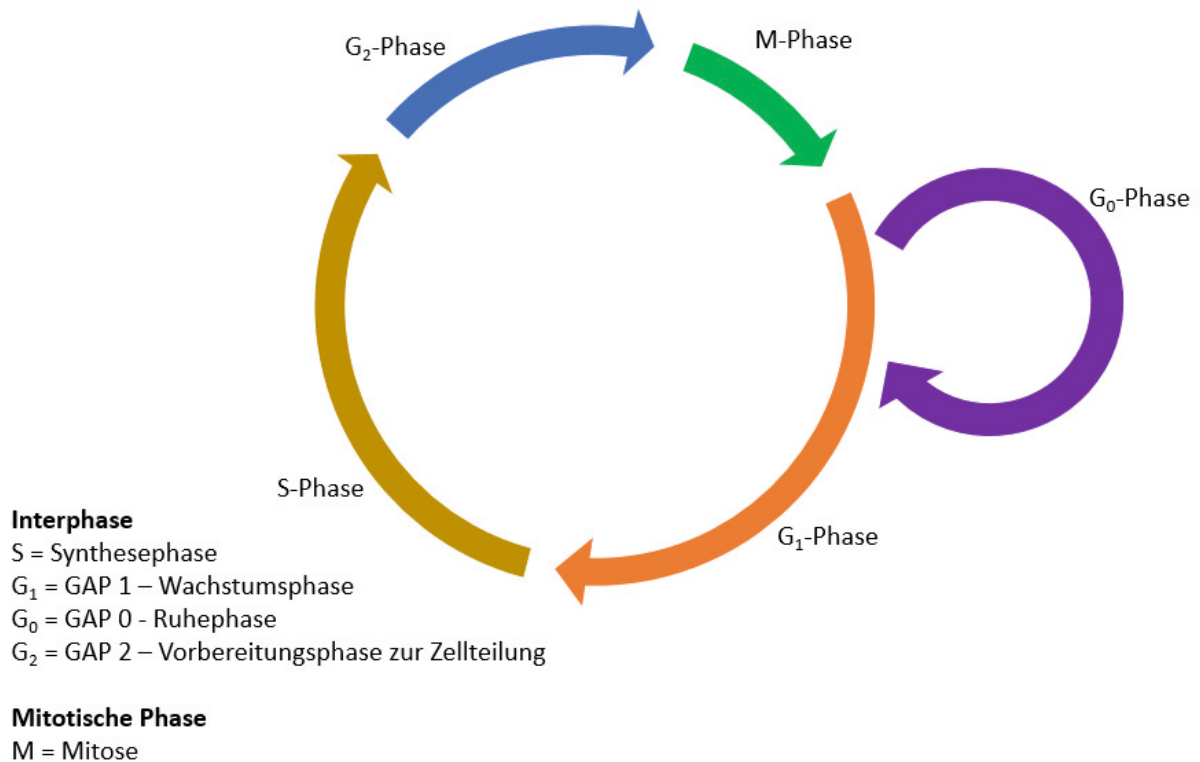
Die Antitumorösen Antibiotika sind ebenfalls Zellzyklus-unabhängige Chemotherapeutika. Ihre Wirkungsmechanismen sind vielfältig, z.B. Interkalation mit der DNA, Hemmung der Topoisomerase II, Radikalbildung und dadurch bedingte Hemmung der DNA-Synthese, sowie Hemmung der RNA-Transkription und Proteinsynthese. Die eingesetzten Medikamente aus dieser Gruppe sind Doxorubicin, Epirubicin, Actinomycin-D und Mitoxantron. All diese Chemotherapeutika sollten streng intravenös verabreicht werden, da es ansonsten zu hochgradigen Gewebnekrosen kommen kann. **Doxorubicin** zeigt in dieser Gruppe und insgesamt bei allen in der Veterinär-onkologie eingesetzten Chemotherapeutika eine hohe Toxizität. Beschriebene Nebenwirkungen sind Myelosuppression, gastrointestinale Probleme, wie Erbrechen und hämorrhagische Kolitis, sowie kardiale Toxizität. Diese unterteilt sich in eine akut auftretende Arrhythmie oder häufiger auftretende chronische Form mit Myokardschädigung. Es handelt sich dabei um eine kumulative Toxizität, sodass eine Gesamtdosis von 180-240mg/m² nicht überschritten werden sollte. Allerdings kommt es in Einzelfällen auch unter der angegebenen Gesamtdosis zur Ausbildung von Myokardschäden. Daneben werden Alopezie und Hyperpigmentation beschrieben. Die Dosierung für Hunde >15 kg beträgt 28-30mg/m² KOF, bei kleineren Hunden sollte eine Dosierung von 1mg/kg Körpergewicht oder 25mg/m² KOF nicht überschritten werden (Carter et al., 1987; Price et al., 1991; Myers et al., 1997; Valerius et al., 1997; Simon et al., 2006; 2008). **Epirubicin** ist ein synthetisches Stereoisomer von Doxorubicin ohne die ausgeprägte Kardiotoxizität, sodass es als Ersatzmedikament bei kardialer Vorbelastung oder Erreichen der kumulativen Gesamtdosis eingesetzt wird. **Actinomycin-D** wird hauptsächlich als Rescue Therapie und in einer Dosierung von 0,9mg/m² KOF eingesetzt. Beschriebene Nebenwirkungen sind Myelosuppression und gastrointestinale Probleme (Moore et al., 1994; Alvarez et al., 2006). **Mitoxantron** ist gut verträglich und wird ebenfalls vor allem als Rescue Therapie eingesetzt. Lediglich geringgradige gastrointestinale Nebenwirkungen und Myelosuppression werden beschrieben. Die

Dosis beträgt 4,5-6,5mg/m² (Moore et al., 1994).

Antimetaboliten sind phasenspezifische Chemotherapeutika und wirken in der S-Phase (DNA Synthese). Ihre Wirkung beruht auf der Blockade der Zellteilung aufgrund ihres Einbaus als „falsche Bausteine“ in die DNA und RNA. Die eingesetzten Medikamente sind Cytarabin und Methotrexat. **Cytarabin** kann die Blut-Hirn Schranke überwinden und wird daher auch gerne bei einer ZNS-Beteiligung eines Lymphoms eingesetzt. Potentielle Nebenwirkungen sind Myelosuppression und gastrointestinale Probleme. Der Grad der Myelosuppression ist dabei von der Applikationsdauer abhängig und steigt bei längerer Dauer an. Es wird subkutan mit einer Dosierung von 60-100mg/m² KOF dreimal täglich über vier Tage im Polychemotherapieprotokoll eingesetzt (Hosoya et al., 2007; Marconato et al., 2008). **Methotrexat** kann intravenös oder oral in einer Dosierung von 0,6-0,8mg/kg alle drei Wochen oder oral mit einer Dosierung von 2,5mg/m² KOF einmal täglich eingesetzt werden. Beschriebene Nebenwirkungen sind hauptsächlich gastrointestinale Probleme in Form von hochgradiger wässriger Diarrhoe (MacEwen et al., 1987; Simon et al., 2008).

Das Enzym **L-Asparaginase** wird zur Behandlung des caninen malignen Lymphoms eingesetzt. Die Aminosäure Asparagin wird für die Synthese von Proteinen, DNA und RNA benötigt. Tumorzellen sind nicht in der Lage die Aminosäure L-Asparagin selbst zu synthetisieren und sind damit auf äußere Quellen angewiesen. Der Wirkmechanismus der L-Asparaginase beruht in der Spaltung des Asparagins und damit in dem Entzug der für die Tumorzelle essentiellen Aminosäure. Die bedeutendste Nebenwirkung ist eine Hypersensitivität, sowie Anaphylaxie; daher sollte vor Verabreichung das Risiko durch vorherige Gabe eines Glukokortikoids oder Antihistaminikums minimiert werden. Seltener treten eine Pankreatitis oder Gerinnungsstörungen auf. Nach Kombination mit Vincristin kann es zur Ausbildung einer hochgradigen Myelosuppression kommen. Das Medikament kann intramuskulär, subkutan oder intraperitoneal in einer Dosierung von 400IU/kg Körpergewicht oder 10.000IU/m² KOF verabreicht werden (Valerius et al., 1997; Jeffreys et al., 2005; Mac Donald et al., 2005; Saba et al., 2007).

Abb 1: Zellzyklusphasen



2.2.2 Chemotherapieprotokolle

Eine Chemotherapie kann als Monotherapie oder als sogenanntes Polychemotherapieprotokoll (Kombination aus verschiedenen Chemotherapeutika) eingesetzt werden. In den letzten 40 Jahren wurde eine Vielzahl an Studien zur Effektivität diverser Chemotherapieprotokolle durchgeführt. In den 1970ern und 1980ern wurde vor allem das COP-Protokoll eingesetzt, welches sich aus Cyclophosphamid, („C“) Vincristin („O“, Oncovin=Vincristin) und Prednison („P“) zusammensetzt. Die Therapie wird meist mit einem Induktionsprotokoll gefolgt von einer langen Erhaltungsphase durchgeführt (Cotter, 1983; Carter et al., 1987; Hahn et al., 1992). Mediane Überlebenszeiten zwischen 224 und 309 Tagen werden beschrieben (Carter et al., 1987). Zwischen 1980 und 1990 wurden die ersten CHOP-Protokolle verwendet, indem man das Chemotherapeutikum Doxorubicin („H“=Hydroxydaunorubicin) in das COP-Protokoll integrierte und damit entscheidende

Verbesserungen der Remissions- und Überlebensraten erhielt (siehe Tabelle 2). In den letzten 15 Jahren zeigten multiple Studien, dass Kurzprotokolle ebenso effektiv wie Protokolle mit Erhaltungsphase sein können, sodass diese vermehrt eingesetzt werden. Ein direkter Vergleich der bisherigen Literatur ist allerdings nur schwer möglich, da diese Studien häufig als Multicenter Studien, in unterschiedlichen Institutionen, von unterschiedlichen Untersuchern und mit unterschiedlichen Protokollen durchgeführt wurden (siehe Tabelle 2).

Der Einsatz von L-Asparaginase erbringt keine verbesserten Überlebenszeiten (Valerius et al., 1997; Mac Donald et al., 2005). Die Patienten zeigen allerdings eine gute Ansprechrate und vor allem Toleranz, so dass das Medikament bei Patienten mit Substadium b, sowie aufgrund der geringen Myelosuppression zur Überbrückung bei längeren Nebenwirkungsphasen vorteilhaft ist. Darüberhinaus zeigen Studien, dass auch der Einsatz von Glukokortikoiden als Bestandteil einer Chemotherapie diskutiert werden muss, da dies keinen signifikanten Effekt auf den Therapieerfolg und die Überlebenszeit zu haben scheint (Zandvliet et al., 2013; Childress et al., 2016).

Der Einsatz von Monotherapien erbringt meist schlechtere Remissions- und Überlebenszeiten (Sauerbrey et al., 2007), wobei Doxorubicin als effektivste Monotherapie bei der Behandlung des caninen multizentrischen malignen Lymphoms angesehen werden kann und vergleichbare Ergebnisse wie beim COP-Protokoll erwartet werden (Hahn et al., 1992; Beaver et al., 2010; Lori et al., 2010; Higginbotham et al., 2013).

Das MOPP Protokoll gilt als Meilenstein in der Onkologie. Es wurde von De Vita 1964 etabliert und war das erste kombinierte Chemotherapieprotokoll zur Behandlung von Menschen mit einem Non-Hodgkin Lymphom (Longo et al., 1986). Rassnick et al. zeigten 2002, dass das MOPP Protokoll ein effektives Rescue-Protokoll zur Behandlung von resistenten Lymphomen beim Hund darstellt, da es auch nach Entwicklung einer „multi-drug-resistance“ des Lymphoms seine Wirksamkeit unter Beweis stellt.

Tabelle 2: Überblick über verschiedene CHOP-Protokolle zur Behandlung des caninen multizentrischen Lymphoms:

Autoren	Protokolldauer (Wochen)	n	Studiendesign		
			(SC/MC)	R/P	Kontrollpopulation
Protokolle mit Erhaltungsphase					
Teske et al., 1990	I: 14 Wochen M: bis zum Rezidiv	62	SC	P	Kohortenstudie (mit und ohne L-Asp)
Stone et al., 1991	I: 4 Wochen M: bis zu78 Wochen	41	SC	P	COPA Protokoll (Cotter and Goldstein 1986)
Keller et al., 1993	I: 9 Wochen M: bis zu max. 168 Wochen	55	SC	P	historische Kontrollen (Literatur; Greenlee et al., 1990, Stone et al., 1991,..)
Myers et al., 1997	I: 4 Wochen M: bis zu 78 Wochen	68	SC	R	ACOPA I – Stone et al., 1991
Zemann et al., 1998	I: 12 Wochen M: bis zu 78 Wochen	98	MC	P	ACOPA II – Myers et al., 1997
Kessler and Kandel 2004	I: 30 Wochen M: bis max. 2 Jahre	57	SC	R	historische Kontrollen (Literatur)
Siedlecki et al., 2006	I: 9 Wochen M: bis zu 104 Wochen	39	SC	R	historische Kontollen (Literatur, vorallem UW-25, Chun et al., 2000, Garrett et al., 2002)
Hosoya et al., 2007	I: 8 Wochen M: bis zum Rezidiv	101	SC	R	COAP vs. UW-19
Simon et al., 2008	I: 6 Wochen M: bis zu 130 Wochen	114	MC	R	Kohortenstudie und historische Kontrollen (Literatur)
Daters et al., 2010	I: 18 Wochen M: bis zu 60 Wochen	65	MC	P	historische Kontrollen (Literatur)
Kurzprotokolle ohne Erhaltungsphase					
Chun et al., 2000	25	49	SC	P	historische Kontrollen UW-Madison Protokoll mit M (Vail et al., 1996)

Moore et al., 2001	15	82	SC	R	VELCAP-L (Zemann et al., 1998)
Garrett et al., 2002	25	53	SC	P	historische Kontrollen UW-Madison Protokoll mit M (Vail et al., 1996)
MacDonald et al., 2005	19	115	SC	R	Kohortenstudie – historische Kontrollen (Literatur)
Simon et al., 2006	12	77	MC	P	historische Kontrollen (Literatur)
Sorenmo et al., 2010	20	130	SC	R	(UW-25, Garrett et al., 2002, Chun et al., 2000)
Rebhuhn et al., 2010	26	24	SC	R	MOPP (Rassnick et al., 2002, Brodsky et al., 2009)
Rassnick et al., 2010	25	66	SC	P	historische Gruppe (n=71) aus der gleichen Institution – behandelt mit einem L-CHOP Protokoll
Burton et al., 2013	15	31	SC	R	Historische Kontrollen (Literatur)
Zandvliet et al., 2013	21	81	SC	P	Kohortenstudie (mit und ohne Prednisolon)

Abkürzungen:

I = Induktionsprotokoll
 M = "Maintenance"=Erhaltungsprotokoll
 n = Patientenzahl
 SC = single center Studie
 MC = multi center Studie
 P = prospektiv
 R = retrospektiv

Kontrollpopulation = in der jeweiligen Studie verwendete oder zum Vergleich herangezogene Kontrollgruppe

COPA = Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison, Doxorubicin

ACOPA	=Prednison, L-Asparaginase, Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin
UW	=University of Wisconsin (L-Asparaginase, Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Prednison)
VELCAP-L	=Vincristin, L-Asparaginase, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Prednison, plus Erhaltungsphase (L = Long)
COAP	=Cyclophosphamid, Vincristin, Cytosin arabinosid, Prednison
MOPP	=Mechlorethamin, Vincristin, Procarbazin, Prednison
L-CHOP	=L-Asparaginase, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison

2.2.3 Handhabung und Entsorgung von Chemotherapeutika

In der Humanmedizin wurden bereits multiple Studien zur richtigen Handhabung und Entsorgung von sogenannten CMR-Arzneimitteln (cancerogen, mutagen, reproduktionstoxisch) veröffentlicht und genaue Richtlinien publiziert. Seit 2009 werden in diesen Richtlinien auch veterinärmedizinische Einrichtungen angesprochen. Daneben wurden spezielle Richtlinien vom European College of Internal Medicine of Companion Animals (ECVIM-CA) entwickelt (ECVIM-CA, Guidelines 2007), auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.

Zytostatika müssen unter Verschluss, in einem extra gekennzeichneten Raum und für Unbefugte unzugänglich aufbewahrt werden (siehe Abb. 2). Dabei ist der Umgang mit Zytostatika nur geschultem Personal gestattet. Der Arbeitgeber ist daher verpflichtet, sein Personal vor Aufnahme der Tätigkeit und im Weiteren einmal jährlich anhand der Betriebsanweisung arbeitsplatzbezogen über die Gefahren mit Zytostatika und möglich zu ergreifenden Schutz- und Verhaltensmaßnahmen zu informieren. Minderjährige, Schwangere, stillende, sowie Frauen die schwanger werden wollen, dürfen nicht mit Zytostatika in Kontakt kommen. Die Zubereitung von Zytostatika darf nur unter Verwendung einer Zytostatika Sicherheitswerkbank erfolgen (siehe Abb. 3), die sich in einem abgetrennten Raum befinden muss. Zur erhöhten Sicherheit einer Freisetzung von Zytostatika sollten sogenannte Druckentlastungssysteme, wie z.B. Entnahme Spikes oder Überleitungssysteme, wie das BD Pha-Seal®-System, sowie zusätzlich Spritzen mit Luer-Lock-Anschlüssen verwendet werden (siehe Abb. 4). Eine Schutzausrüstung,

bestehend aus Zytostatika-Handschuhen, flüssigkeitsundurchlässigem Kittel mit langen Ärmeln oder Armstulpen mit engen Bündchen, muss getragen werden. Vor der intravenösen Verabreichung von Zytostatika über einen peripheren Verweilkatheter sollte der korrekte Sitz überprüft werden. Alle Zytostatikareste, sowie alle mit Zytostatika in Kontakt gekommene Materialien müssen als Sondermüll entsorgt werden. Der Abfallbehälter muss verschließbar und gekennzeichnet sein.

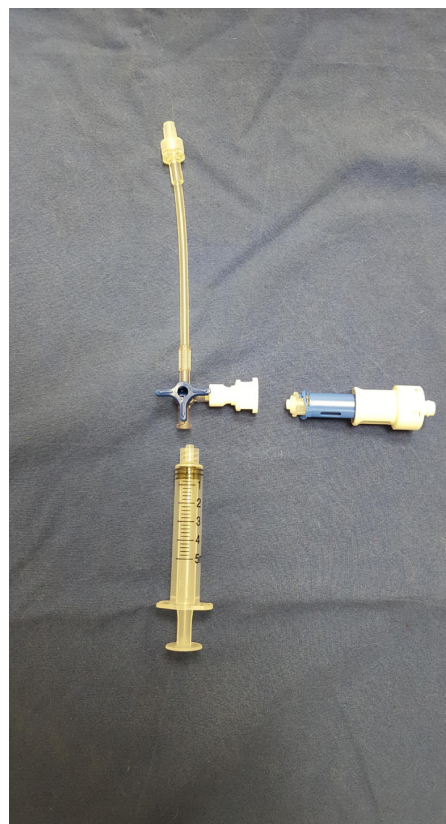
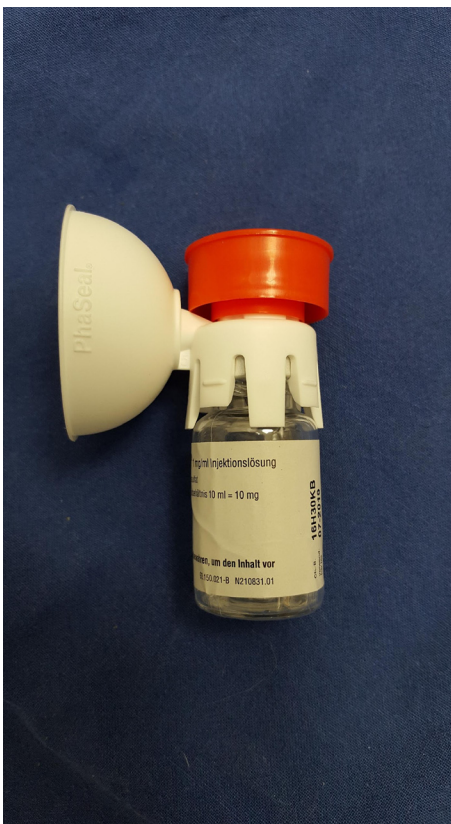
Abb. 2: Gekennzeichneter Raum zur Aufbewahrung von Zytostatika



Abb. 3 Sicherheitswerkbank zur Zubereitung der Zytostatika



Abb. 4 BD Pha-Seal®-System und Applizierhilfe mit Luer Lock Spritze



2.2.4 Rezidivbehandlung

Circa zwei Drittel der mit Chemotherapie behandelten Hunde erfahren im Laufe ihrer Erkrankung ein Rezidiv (Dobson et al., 2001; Teske, 2013). Je nach Rezidivzeitpunkt können unterschiedliche Rezidivbehandlungen durchgeführt werden. Bei einem Rezidiv nach Abschluss eines Chemotherapieprotokolls kann eine sogenannte "Reinduktion" mit demselben Protokoll erfolgreich sein. Kommt es bereits während einer Behandlung zum Rezidiv sollte eine sogenannte "Rescue" Therapie mit neuen Medikamenten durchgeführt werden (Teske, 2013). Rescue Protokolle mit L-Asparaginase und Doxorubicin, wenn sie vorher noch nicht angewendet wurden, sowie Lomustin (Flory et al., 2008) werden beschrieben. Rassnick et al. (2002) berichten mit ihrem MOPP-Rescue-Protokoll von Remissionsraten um die 70 %. Allen gemein sind allerdings die kurzen Remissionszeiten von medianen 2-4 Monaten.

2.2.5 Mechanismen der Resistenzbildung beim malignen Lymphom

Die Entwicklung einer Medikamentenresistenz gegenüber Chemotherapeutika führt beim caninen malignen Lymphom früher oder später zum Therapieversagen und damit letzten Endes zum Tod des Patienten. Die Mechanismen der Resistenzbildung sind dabei sehr verschieden und bis heute nicht 100%ig geklärt (Bergman, 2003; Król et al., 2010). Es werden erworbene und inhärente Resistenzmechanismen unterschieden. Der wichtigste erworbene Mechanismus ist die Ausbildung einer „Multidrug-Resistance“ (MDR) aufgrund des Permeability—Glycoprotein (P-gp) (Moore et al., 1995; Król et al., 2010; Zandvliet et al., 2014). Es ist ein Oberflächenmolekül, welches zur beschleunigten Ausschleusung von Chemotherapeutika aus der Tumorzelle und somit zur verminderten Wirksamkeit oder kompletten Resistenz führt (Kartner et al., 1983; Scotto et al., 1986; Zandvliet et al., 2014). Das „Multidrug resistance related protein“ (MRP), dessen Struktur der von P-gp ähnelt, sowie das Enzym Glutathion-S-transferase tragen ebenfalls zu einer MDR bei. Die Glutathion-S-transferase führt zur erhöhten Detoxifizierung und damit zu verminderten zytotoxischen Effekten der Chemotherapeutika Doxorubicin, Cyclophosphamid und Platinderivaten (Hahn et al., 1999; Bergman, 2003). Weitere

beschriebene erworbene Mechanismen sind die verminderte Einleitung der Apoptose, beschleunigte DNA-Reparaturmechanismen oder Veränderungen der Zytostatika und damit einem Ausbleiben der Aktivierung von Chemotherapeutika (Bergman, 2003). Beschriebene inhärente Faktoren sind z.B. eine erhöhte Fähigkeit zur Detoxifizierung der Tumorzelle, sowie Rezeptorveränderungen oder komplettes Fehlen von Rezeptoren und damit einer verminderten Aufnahme von Chemotherapeutika in die Tumorzelle (Hirschberger, 2013).

2.3 Prognostische Faktoren

Es lassen sich multiple Studien zu möglichen prognostischen Faktoren beim caninen multizentrischen Lymphom finden, auf die im Anschluss näher eingegangen werden soll.

2.3.1 Vorbehandlung mit Kortikosteroiden

Eine Vorbehandlung mit Kortikosteroiden ist mit der Remissions- und Überlebenszeit negativ korreliert (Price et al., 1991; Piek et al., 1999; Vail et al., 2001). Dies ist auf eine Resistenzbildung der Tumorzellen auf die Chemotherapeutika zurückzuführen, wobei der zugrundeliegende Mechanismus bei der Lymphomkrankung nicht abschließend geklärt ist (Mealey et al., 2003; Sauerbrey et al., 2007). Es wird eine induzierte Multi-Drug Resistance durch eine Expression eines Glykoproteins (P-gp) in der Zellmembran vermutet (Moore et al., 1995; Vail et al., 2001; Rassnick et al., 2002).

2.3.2 Stadium und Substadium

Der Einfluss des Stadiums auf Remissions- und Überlebenszeiten ist umstritten. Die meisten Autoren sehen keine signifikanten Unterschiede (Squire et al., 1973; Greenlee et al., 1990; Hahn et al., 1992; Keller et al., 1993; Zemmann et al., 1998; Kiupel et al., 1999). Andere Autoren sehen schlechtere Remissions- und/oder Überlebenszeiten bei

Patienten im Stadium V im Gegensatz zu Patienten im Stadium I bis IV (Myers et al., 1997; Vail und Young, 2007). Verbesserte Überlebenszeiten bei Stadium II im Vergleich zu Stadium III (Dobson et al., 2001), bzw. Stadium III im Vergleich zu Stadium IV oder V werden ebenfalls beschrieben (Teske et al., 1994a).

Das Substadium b wird in den meisten Studien als negativ prognostischer Faktor im Hinblick auf Remissions- und/oder Überlebenszeiten angegeben (Greenlee et al., 1990; Keller et al., 1993; Myers et al., 1997; Zemmann et al., 1998; Garrett et al., 2002; Simon et al., 2008). Allerdings existieren bisher keine standardisierten Kriterien zur genauen Einteilung der Symptome. Die WHO definiert das Substadium lediglich mit "mit und ohne klinische Anzeichen einer Erkrankung". Barber und Weishaar veröffentlichten daher 2016 einen Überblick über mögliche praxisbezogene Einteilungen im Hinblick auf das Substadium als Basis für zukünftige standardisierte Kriterien und ihrer assoziierten Prognosen (Barber und Weishaar 2016).

2.3.3 Immunphänotyp (B- und T-Zell)

Für T-Zell Lymphome wird immer wieder eine schlechtere Prognose angegeben (Moore et al., 1994; Teske et al., 1994 a, b; Valerius et al., 1997; Chun et al., 2000; Dobson et al., 2001; Ponce et al., 2004). Dementsprechend werden im Umkehrschluss bei B-Zell Lymphomen längere Remissions- und Überlebenszeiten, sowie eine bessere Ansprechrate im Hinblick auf vollständige Remissionen gesehen (Greenlee et al., 1990; Chun et al., 2000). Dies könnte mit vermehrten chromosomalen Aberrationen bei T-Zell im Vergleich zu B-Zell Lymphomen und damit einer deutlich ungeordneteren Zellteilung im Zusammenhang stehen (Thomas et al., 2003). Daneben zeigen neuere Untersuchungen mit der Möglichkeit der weiteren Subtypisierung der Lymphomphänotypen, dass nicht alle T-Zell und B-Zell Lymphome gleich agieren (Ponce et al., 2004). So hat z.B. ein kleinzelliges T-Zell Lymphom eine sehr gute Prognose und ein „Burkitt-Lymphom“, welches zu den B-Zell Lymphomen zählt eine deutlich schlechtere Prognose (Ponce et al., 2004; Moore, 2016).

2.3.4 Geschlecht und Alter

Alter und Geschlecht wurden vielfach auf ihren Einfluss im Hinblick auf Remissions- und Überlebenszeiten untersucht, wobei widersprüchliche Angaben in der Literatur zu finden sind. Die meisten Autoren sehen im Alter keine prognostische Bedeutung (MacEwen et al., 1987; Greenlee et al., 1990; Teske et al., 1994a, b; Kiupel et al., 1999). Zemmann et al. (1998) beschreiben einen Vorteil bei jüngeren Hunden im Hinblick auf eine vollständige Remission und Toleranz bei aggressiven Chemotherapieprotokollen.

Weibliche Hunde werden in einigen Studien mit verlängerten Remissions- und/oder Überlebenszeiten gesehen (MacEwen et al., 1987; Keller et al., 1993; Sauerbrey et al., 2007). Im Gegensatz dazu kann diese Aussage von anderen Autoren nicht bestätigt werden (Greenlee et al., 1990; Hahn et al., 1992; Teske et al., 1994a, b).

2.3.5 Hyperkalzämie

Das paraneoplastische Syndrom Hyperkalzämie wird mit T-Zell Lymphomen in Verbindung gebracht (Greenlee et al., 1990, Teske et al., 1994a, b) und wird dementsprechend als negativer prognostischer Faktor angegeben (Greenlee et al., 1990; Teske et al., 1994 a, b; Valerius et al., 1997; Baskin et al., 2000). Im Gegensatz dazu sehen andere keinen Einfluss einer Hyperkalzämie auf die Überlebenszeiten (Cotter et al., 1983; Keller et al., 1993; Myers et al., 1997). Ursächlich für die sogenannte ektopische Form der paraneoplastischen Hyperkalzämie bei einem malignen caninen Lymphom ist hauptsächlich die Produktion eines Parathormon ähnlichen Peptids (PTH-rP) durch die Tumorzelle. Dadurch werden Osteoklasten aktiviert und damit Kalziumreserven mobilisiert, zusätzlich wird die Kalziumrückresorption in der Niere gefördert (Kubota et al., 2002; Bergman, 2012). Nadella et al. zeigten, dass der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese der paraneoplastischen Hyperkalzämie bei dem caninen malignen Lymphom spielt. Daneben scheinen eine Vielzahl an Interleukinen, darunter IL-1 β die Produktion von PTH-rP und TNF- α zu steigern und hochzuregulieren (Nadella et al., 2008).

2.3.6 Weitere prognostische Faktoren

Thrombozytopenie bei Diagnosestellung wird von einigen Autoren als prognostisch günstiger Faktor im Hinblick auf die Überlebenszeiten angegeben (Garrett et al., 2002; Rebhuhn et al., 2010). Es wurde ein Zusammenhang einer Thrombozytopenie mit speziellen histologischen Lymphom-Subtypen vermutet, die mit längeren Überlebenszeiten assoziiert sind (Rebhuhn et al., 2010), andere konnten dies nicht bestätigen (Myers et al., 1997; Zemmann et al., 1998).

Der **histologische Grad** des malignen Lymphoms wird teilweise als wichtiger prognostischer Faktor beschrieben. Aus der Humanmedizin macht man sich histologische Klassifizierungsschemata wie die KIEL-Klassifikation (Lennert, 1975), die später modifiziert wurde, und die Working Formulation (Rosenberg et al., 1982) zum Nutzen. Die KIEL-Klassifikation wird als sehr geeignete Einteilung für das canine maligne Lymphom angesehen (Greenlee et al., 1990; Dobson et al., 2004), obwohl Limitationen im Hinblick auf die zytologische Diagnosestellung vieler Subtypen bestehen (Landgren et al., 2004). Beide Klassifizierungsschemata zeigen bei "high-grade" Lymphomen signifikant bessere Remissionsraten (Greenlee et al., 1990; Teske et al., 1994b). Bei den Untersuchungen von Teske et al. (1994b) werden im Gegensatz zu Greenlee et al. (1990) allerdings kürzere Überlebenszeiten festgestellt. Dies ist vermutlich auf eine anfänglich hohe Wachstumsrate und damit verbundene höhere Empfindlichkeit der Tumorzelle gegenüber Chemotherapeutika und folgender schneller Mutations- und Resistenzbildung zurückzuführen (Teske et al., 1994b). Die aktuellste WHO Einteilung beruht auf der REAL-Klassifikation (Swerdlow et al., 2008).

Die Anzahl der **AgNOR (Argyrophilic nucleolar organizer regions)** und die **T_{pot} (potenzielle Verdopplungszeit)** werden ebenfalls als prognostische Faktoren angegeben (Vail et al., 1996; Fournel-Fleury et al., 1997; Kiupel et al., 1999; Bauer et al., 2007). Die AgNORs sind Regionen, in denen die rRNA (ribosomale RNA)-Gene lokalisiert sind. Ihr Vorhandensein ist für die Transkription dieser Gene strikt notwendig. Dabei reflektiert die Anzahl und Größe der AgNOR Regionen die Rate und Geschwindigkeit der Zellproliferation. Die potenzielle Verdopplungszeit bezeichnet die potenzielle Volumenverdopplungszeit von Tumoren in Abwesenheit von Zellverlust unter

Einbeziehung der Zellzykluszeit und der Wachstumsfraktion, d.h. der Zahl der sich teilenden Tumorzellen im Vergleich zu der Gesamtzellzahl des Tumors. Eine niedrigere Proliferationsaktivität ist mit schlechteren Remissions- und Überlebensraten assoziiert, da die Zelle in ihrer Ruhephase vermutlich schlechter auf eine Chemotherapie anspricht.

Die **Serumthymidinkinase** wurde ebenfalls als potenter prognostischer Tumormarker evaluiert. Es ist ein Enzym, das durch Umbauprozesse beim Einbau des Nukleosids Thymidin in die DNA beteiligt und damit essentiell für den DNA Aufbau ist. Es wird vor allem von proliferierenden Zellen in der Interphase gebildet, somit stellt die Thymidinkinase-Konzentration ein Maß für Teilungsaktivität von Zellen dar, die bei Tumorzellen deutlich erhöht ist. Von Euler beschreibt kürzere Überlebenszeiten bei initial erhöhter Serumthymidinkinaseaktivität (2004).

In einer neueren Studie konnte bei Hunden mit Lymphom eine initiale **Hyperferritinämie** als negativ prognostisch im Hinblick auf die Überlebenszeit detektiert werden. Ferritin ist ein Eisenspeicher- und akute-Phase-Protein, jedoch ist die genaue Ätiologie seiner Erhöhung bei einigen Lymphompatienten derzeit unklar (Chikazawa et al., 2015).

2.4 Ziel und Hypothese

Ziel der vorliegenden Studie war der Vergleich des gleichen CHOP-LAsp Protokolls mit und ohne Erhaltungsphase an einem weit größeren Patientengut als bisher beschrieben von über 400 Patienten. Um interinstitutionelle Varianzen zu umgehen, wurden alle Patienten in derselben Institution, von denselben Onkologen und unter gleichen Bedingungen behandelt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass unter diesen Voraussetzungen Chemotherapieprotokolle mit Erhaltungsphase zu signifikant verlängerten Überlebenszeiten führen.

Darüberhinaus wurde anhand des Datenmaterials erstmals eine epidemiologische Studie zum multizentrischen Lymphom in Deutschland durchgeführt und zwei Bezugsgrößen (krankenversicherte Hunde und Gesamtpatientenpopulation der

Tierklinik Hofheim) als Vergleichspopulation eingesetzt. Ziel war die erstmalige Erhebung und Veröffentlichung von repräsentativen epidemiologischen Daten im Hinblick auf Rasse, Alter, Geschlecht, Gewicht und der Anteil der Patienten mit Hyperkalzämie bzw. T- und B-Zell Lymphom zum caninen multizentrischen Lymphom in Deutschland. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sowohl die Population krankenversicherter Hunde eines Landes, als auch die Gesamtpopulation einer großen Klinik eines Landes als Bezugsgröße zur Feststellung von Rasseprädispositionen eingesetzt werden können.

3 Eigene Arbeiten

LAUTSCHAM, E. M., KESSLER, M., ERNST, T., WILLIMZIG, L., NEIGER, R. (2017) Comparison of a CHOP-LAsp based protocol with and without maintenance for canine multicentric lymphoma. Veterinary Record 180, 303 Epub

ERNST, T., KESSLER, M., LAUTSCHAM, E. M., WILLIMZIG, L., NEIGER, R. (2016) Das multizentrische maligne Lymphom beim Hund – eine epidemiologische Studie mit 411 Patienten. Tierärztliche Praxis Ausgabe Kleintiere Heimtiere 17, 245-251

3.1 Publikation 1

Paper

Comparison of a CHOP-LAsp-based protocol with and without maintenance for canine multicentric lymphoma

E. M. Lautscham, M. Kessler, T. Ernst, L. Willimzig, R. Neiger

The recommendation to treat canine lymphoma with a discontinuous protocol is based on small case numbers and mostly historic controls. This study compares duration of first remission (DFR) and overall survival time (ST) with a discontinuous protocol to the same protocol with maintenance phase. 408 dogs were treated with a CHOP-LAsp (C=cyclophosphamide; H=hydroxydaunorubicin; O=Oncovin; P=prednisolone; LAsp=L-asparaginase)-based 28-week induction protocol. In 75 dogs (cohort 1), this was followed by a maintenance phase consisting of vincristine, chlorambucil and actinomycin-D with a total treatment duration of two years. In the subsequent 333 dogs, therapy was discontinued after induction (cohort 2). Median DFR and ST in cohort 1 were 216 and 375 days and 184 and 304 days in cohort 2. 6-Month, 1-year and 2-year survival rates in cohort 1 were 73 per cent, 50 per cent, 24 per cent and 67 per cent, 39 per cent, 21 per cent in cohort 2. There was no significant difference between the two protocols ($P=0.291$ for ST, $P=0.071$ for DFR). On multivariate analysis, corticosteroid pretreatment ($P=0.005$), thrombocytopenia at diagnosis ($P=0.019$), stage ($P=0.009$), substage b at relapse ($P<0.001$), age ($P=0.002$) and incomplete or unstable remission necessitating intensification of therapy ($P=0.004$) were negatively correlated with ST in both groups. This study supports the use of a discontinuous protocol for canine multicentric lymphoma.

Canine multicentric lymphoma is treated with systemic chemotherapy, and there are numerous studies investigating different chemotherapy protocols with regard to efficacy and adverse effects. In the 1970s and 1980s, protocols consisting of Cyclophosphamide, vincristine and Prednisone (COP) were used for induction of remission and were usually followed with a prolonged period of 'maintenance' therapy mostly involving prednisone and cytotoxic drugs such as chlorambucil and methotrexate (Cotter 1983, Carter and others 1987, Hahn and others 1992, Boyce and Kitchell 2000, Jeffreys and others 2005). In the 1980s and 1990s, Doxorubicin was added to the COP induction protocol, making it a 'CHOP-protocol'. Various CHOP-based protocols were published following these decades, all consisting of a CHOP-based induction phase, again followed by a prolonged maintenance phase (Teske and others 1990, Stone and others 1991, Keller and others 1993, Myers and others 1997, Zemmann and others 1998, Kessler and Kandel 2004, Siedlecki and others 2006, Simon and others 2008, Daters and others 2010).

Over the past 15 years, various studies have suggested that discontinuous polychemotherapy protocols ranging from 12 to 26 weeks total duration without a maintenance phase are equally or even more effective than the older continuous protocols with maintenance therapy (Chun and others 2000, Moore and others 2001, Garrett and others 2002, MacDonald and others 2005, Simon and others 2006, Hosoya and others 2007, Rassnick and others 2010, Simon 2010, Sorenmo and others 2010). However, this observation is based on relatively small numbers of dogs ($n=24-130$). In addition, most of these studies used published historic data from continuous protocols as controls, accepting the disadvantage of comparing a completely different induction protocol from a different institution to a new discontinuous protocol (Behera and others 2007). This suboptimal approach makes a meaningful comparison rather challenging, and a study re-evaluating the use of maintenance therapy after a CHOP-based induction protocol in a larger number of dogs seems desirable.

The goal of this present study was to compare the same CHOP-LAsp protocol with and without a prolonged maintenance phase on a large study population, treated in the same institution and by the same clinicians. It was hypothesised that a polychemotherapy protocol with maintenance phase proves superior to a discontinuous protocol when conducted as a cohort study of comparable patient composition in a single institution eliminating interinstitutional variances and the disadvantage of using historic controls. Aside from protocol duration, other factors historically known to influence the outcome in canine lymphoma such as T/B-immunophenotype, stage, substage and corticosteroid pretreatment (Greenlee and others 1990, Myers and others 1997, Kiupel and others 1999, Piek and others 1999,

Veterinary Record (2016)

doi: 10.1136/vr.104077

E. M. Lautscham, BVSc,
M. Kessler, Dmedvet, DiplECVIM-CA
(Onc),

T. Ernst, Dmedvet,
L. Willimzig, Dmed vet,
Small Animal Clinic Hofheim,
Katharina-Kemmler-Str. 7, Hofheim
65719, Germany

R. Neiger, Prof, Dmedvet, PhD,
DiplACVIM, DiplECVIM-CA,

Small Animal Clinic, Internal Medicine,
Justus-Liebig-University Giessen,
Frankfurter Str. 126, Giessen 35392,
Germany

E-mail for correspondence:
e.lautscham@tierklinik-hofheim.de

Provenance: Not commissioned;
externally peer reviewed
Accepted December 8, 2016

Dobson and others 2001, Jagielski and others 2002, Sauerbrey and others 2007, Simon and others 2008, Rebhun and others 2011) were also evaluated to assess if any of these were of greater importance than the duration of therapy.

Materials and methods

All 408 dogs with multicentric high-grade lymphoma treated with polychemotherapy at the Small Animal Clinic Hofheim (Germany) between 1997 and 2011 were retrospectively analysed. The diagnosis had been established in all dogs before therapy by fine needle aspiration or Tru-Cut biopsy of one or multiple enlarged peripheral lymph nodes and staging was performed according to the WHO staging system (Owen 1980) including two-view chest x-rays, abdominal ultrasound, haematology including blood smear and clinical chemistry profile. Patient data including tumour grade, imaging findings and staging information were taken from the clinical records. No systematic review of the histopathological or cytological slides or radiographic images was performed. Immunophenotyping (CD 3, CD 79a) was performed in 129 dogs. Bone marrow biopsies were not routinely performed but all dogs with >5 per cent lymphatic blast cells on blood smear were defined as leukaemic lymphoma and classified as stage V. Clinical substage was recorded at time of initiation of therapy and at time of relapse. Glucocorticoid pretreatment by a referring veterinarian was defined as any application of a steroid longer than seven days before initiation of chemotherapy.

All 75 dogs presented between 1997 and 2003 were treated with a CHOP-LAsp (C=cyclophosphamide: Endoxan; Baxter S.A.; H=hydroxydaunorubicin—doxorubicin: Doxo-cell; STADA; O=Oncovin—vincristine: cell-cristin; STADA; P=prednisolone: Prednisolon; cp-pharma; LAsp=l-asparaginase: Asparaginase; Medac GmbH) induction protocol of approximately seven months duration followed by a maintenance phase consisting of vincristine, chlorambucil (Leukeran; Aspen), l-asparaginase and actinomycin-D (Cosmegen, Lyovac; Merck & Co.). If dogs remained in remission, maintenance therapy was discontinued after a total treatment duration of two years (cohort 1, Hofheim I protocol, Table 1). From 2004 to 2011, 333 dogs were treated with the same CHOP-LAsp induction protocol but without a maintenance phase (cohort 2, Hofheim II protocol, Table 1). Rescue therapy using various protocols was initiated when dogs came out of remission. In cases of side effects, dose modifications were undertaken sporadically. In cases with incomplete or unstable remission during the induction phase, intensification was usually performed by replacing cytarabine (ARA-cell; STADA) with lomustine (CeCeNu; Medac GmbH).

All dogs were examined and treated by the same small group of clinical oncologists. Response to therapy was defined as complete remission (CR) if after the first cycle of the induction protocol all peripheral lymph nodes returned to physiological

size with complete resolution of tumour-associated symptoms including hypercalcaemia (if present). Partial remission (PR) was defined as a >50 per cent but <100 per cent remission and no remission (NR) as increase in lymph node size and/or recurrence of hypercalcaemia, or less than 50 per cent regression of measurable tumour size. Chemotherapy-induced adverse effects were classified and documented according to the Criteria of the Veterinary Co-operative Oncology Group (VCOG—CTCAE 2004), but no comparative evaluation was done in the context of this study.

All data were registered in Microsoft Excel 2011 and statistically analysed using a commercial software package (SPSS V.22). Duration of first remission (DFR) was calculated from the first day of therapy until clinical signs of relapse were identified or until the patient died or was lost to follow-up. The survival time (ST) was defined as the time from the first day of therapy until death for any reason. Dogs not dying of tumour-associated reasons or lost to follow-up were censored. The information about the reasons of death was taken from the clinical records or from enquiries with the owner and/or referring veterinarian and was based on the documentation of progressive disease unresponsive to chemotherapy in conjunction with poor quality of life. Dogs with unclear reason of death were censored. None of the dogs had postmortem examination performed after death. The ST in dogs that were still alive at the time of evaluation was calculated from the first day of therapy until the time of closure of the study on December 31, 2013, thus making up for a minimum follow-up time of two years after initiation of therapy. Dogs with an unknown date of death were assigned as 'lost to follow-up' and censored at the time of their last follow-up.

Differences between both protocols regarding DFR and overall ST were analysed using Kaplan-Meier log-rank analysis. In addition, multivariate Cox forward regression was used to evaluate the following other prognostic variables for their association with DFR and overall ST: clinical stage, substage at time of diagnosis and at time of relapse, corticosteroid pretreatment before initiation of chemotherapy, B/T-immunophenotype, presence of hypercalcaemia (total serum calcium concentration above reference range) or thrombocytopenia at the time of diagnosis (defined as platelet counts of <200,000 cells/ μ l whole blood) and the need to intensify induction therapy using lomustine. The cause of death was categorised as death or euthanasia due to tumour-related reasons (progressive disease and/or decreased quality of life) and non-tumour-related reasons. Results with $P \leq 0.05$ were considered significant.

Results

Study population

The 408 dogs belonged to a total of 86 breeds, with the following breeds represented by ≥ 10 dogs: mixed breed ($n=113$),

TABLE 1: Hofheim CHOP-LAsp protocol (with or without maintenance phase)

Drugs and dosages	Day					
	1	4	10	20-24	32	40
Vincristine: 0.65-0.75 mg/m ² intravenous	*					
l-Asparaginase: 10,000 IU/m ² intramuscular		*			*	
Cyclophosphamide: 180-200 mg/m ² orally			*			
Cytarabine: 60 mg/m ² subcutaneous every 8 hours on four consecutive days				*		
Doxorubicin: 25-30 mg/m ² intravenous						*
Induction protocol: four cycles with a duration of 40 days every cycle. Between the cycles, there is a break of 14 days						
Prednisone is used for the first four weeks in a tapering dose. First week 2 mg/kg every 24 hours, second week 1 mg/kg every 24 hours, third week 0.5 mg/kg every 24 hours and fourth week every second day 0.5 mg/kg						
Maintenance protocol (cohort 1 only): vincristine: 0.65-0.75 mg/m ² intravenous; chlorambucil 1.4 mg/kg orally; l-asparaginase 10,000 IU/m ² intramuscular; actinomycin-D 0.6-0.7 mg/m ² intravenous						
For four months, drugs are administered in two-week intervals then for six months in three-week intervals followed by four-week intervals for a total therapy duration of two years. Discontinuation of therapy after two years if dog is in complete remission						
Intensification: lomustine: 60-80 mg/m ² orally						
*Drug administered.						
CHOP-LAsp, C=cyclophosphamide; H=hydroxydaunorubicin; O=Oncovin; P=prednisolone; LAsp=l-asparaginase.						

golden retriever (n=25), Rottweiler (n=23), Bernese mountain dog (n=22), West Highland white terrier (n=12), Briard (n=11), American Staffordshire terrier (n=11) and labrador retriever (n=10). The median age of all dogs was 7.9 years (range: 2–15 years) and the median bodyweight was 30.2 kg (range: 1.1–75 kg). In total, 224 dogs were male (with 75 castrated) and 184 dogs were female (with 87 spayed). The epidemiological characteristics of the study population have been published elsewhere (Ernst and others 2015).

In total, 6 of the 408 dogs (1.5 per cent) were WHO stage I, 15 (3.7 per cent) stage II, 178 (43.6 per cent) stage III, 125 (30.6 per cent) stage IV and 84 (20.6 per cent) stage V. Also, 271 of the 408 dogs (66.4 per cent) were substage a and 137 (33.6 per cent) substage b. A total of 126 dogs (30.9 per cent) had thrombocytopenia at time of diagnosis (median 150,000 cells/ μ l, range: 12,700–199,000 cells/ μ l). Also, 113 of the 408 dogs (27.7 per cent) had been pretreated with corticosteroids by the referring veterinarian. Since immunophenotyping was not routinely available in Germany in the early phases of the study, only 129 dogs in cohort 2 were immunophenotyped, resulting in 102 B cell (79.1 per cent) and 27 T cell lymphomas (20.9 per cent). Total serum calcium concentration was measured in 348 dogs (85.3 per cent) and hypercalcaemia was detected in 42 (12.1 per cent) of these cases.

There was no statistically significant difference in the composition of the two dog cohorts regarding the distribution of breed, gender, age, weight and clinical stage of disease.

Treatment response and STs

In total, 317 of the 408 dogs (77.7 per cent) reached a CR on the induction protocol and the response rate did not differ between both treatment protocols ($P=0.206$).

The median DFR for dogs treated with the Hofheim I protocol (216 days; range: 147–284 days) was not significantly different ($P=0.071$) from dogs treated with the Hofheim II protocol (184 days; range: 145–222 days). Using Cox regression analysis, no significant association was detected between the DFR of both study cohorts and age, gender, bodyweight, corticosteroid pretreatment, substage, hypercalcaemia, thrombocytopenia and T/B-immunophenotype.

The median overall ST for the 75 dogs treated with the Hofheim I protocol was 375 days (range: 3–3982 days), and the 6-month, 1-year and 2-year survival rates were 73 per cent, 50 per cent and 24 per cent, respectively. The median overall ST for the 333 dogs in cohort 2 was 304 days (range: 1–3374 days), and the 6-month, 1-year and 2-year survival rates were 67 per cent, 39 per cent and 21 per cent, respectively. There was no significant difference between the two treatment cohorts regarding overall ST and survival rates (log-rank test $P=0.291$) (Fig 1).

When only the dogs that completed the induction protocol were analysed (n=245), the median overall ST for the 50 dogs treated with the Hofheim I protocol was 481 days (range: 204–3982 days), and the 1-year and 2-year survival rates were 70.5 per cent and 35 per cent, respectively. The median overall ST for the 195 dogs treated with the Hofheim II protocol was 426 days (range: 204–3374 days), and the 1-year and 2-year survival rates were 59 per cent and 30.8 per cent, respectively. Again, there was no significant difference between the two treatment cohorts regarding overall ST and survival rates (log-rank test $P=0.573$). A total of 165 dogs were in CR after finishing the induction protocol and had data available regarding the exact time of relapse. When this subset of dogs was analysed and compared between both treatment cohorts, the DFR for the 33 dogs that were continued on the maintenance protocol (Hofheim I protocol) was 358 days (range: 337–378 days) and the DFR for the 132 dogs that received no further therapy until relapse (Hofheim II protocol) was 292 days (range: 260–323 days). There was no significant difference in DFR between both treatment groups ($P=0.108$).

On multivariate analysis, corticosteroid pretreatment ($P=0.005$), thrombocytopenia at the time of diagnosis

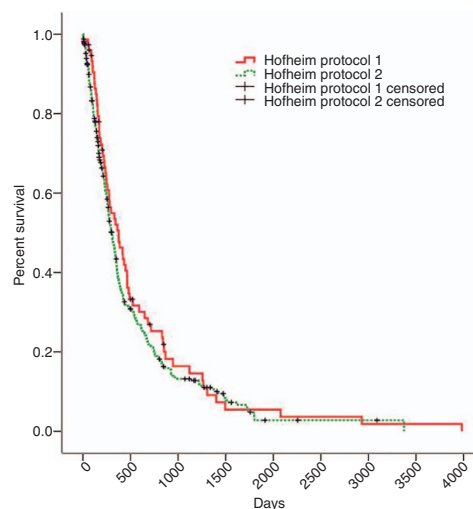


FIG 1: Kaplan-Meier plot comparing overall survival time in dogs receiving Hofheim 1 protocol (with maintenance) and dogs receiving Hofheim 2 protocol (without maintenance)

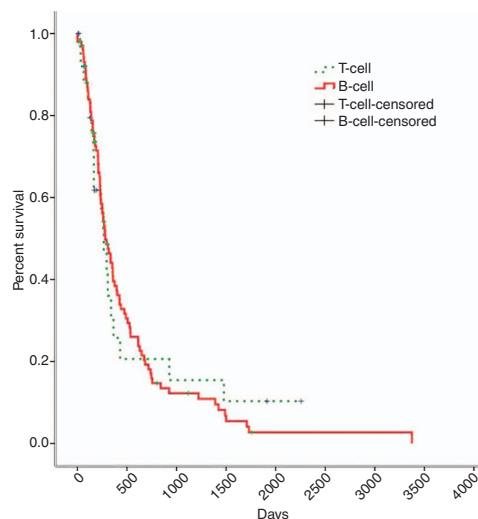


FIG 2: Kaplan-Meier plot comparing survival time depending on T cell and B cell phenotype independent of protocol used

(<200,000 cells/ μ l whole blood $P=0.019$), age ($P=0.002$), incomplete or unstable remission necessitating the use of lomustine ($P=0.004$), substage b at time of relapse ($P<0.001$) and stage ($P=0.009$) were negatively correlated with ST. ST was not significantly influenced by T/B-immunophenotype ($P=0.909$) (Fig 2), presence of hypercalcaemia ($P=0.593$) or substage at beginning of therapy ($P=0.255$). The six dogs in WHO stage I had longer ST compared with the dogs in more advanced stages. By censoring the dogs in WHO stage I from the multivariate analysis, stage was no longer significantly associated with overall ST ($P=0.262$) (Fig 3).

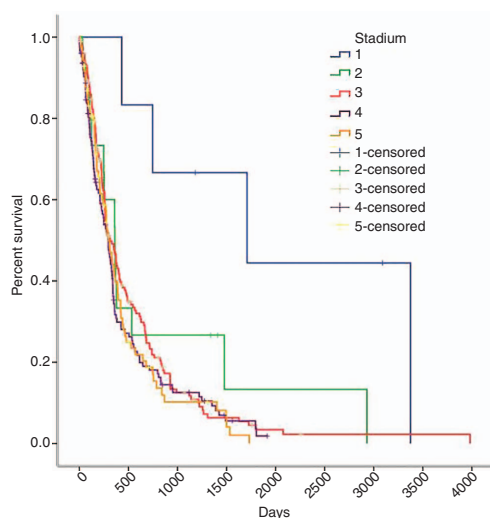


FIG 3: Kaplan-Meier plot comparing the survival time according to WHO stage independent of protocol used. Patients in stage I had a significantly improved survival time compared with all other stages

A total of 258 dogs (cohort 1 $n=51$, cohort 2 $n=207$) experienced a relapse during treatment. Also, 134 of the 258 dogs (51.9 per cent) received a rescue therapy with a similar proportion in both treatment cohorts (28/51 dogs (54.9 per cent) and 106/207 (51.2 per cent), respectively. The median duration of the second remission for dogs with the Hofheim I protocol was 73 days (range: 23–122 days) and 97 days (range: 81–112 days) for dogs treated with the Hofheim II protocol ($P=0.141$).

The cause of death was recorded for 340 dogs: 268 dogs (78.8 per cent) died or were euthanased due to tumour-related reasons and 72 (21.2 per cent) died or were euthanased for reasons unrelated to the lymphoma.

Discussion

Globally, the Madison-Wisconsin protocol is the most widely used CHOP-LAsp-based protocol besides the 'original' continuous protocol published by Keller and others (1993), and variations without maintenance phase with 25-week, 19-week and 12-week duration have been published (Garrett and others 2002, MacDonald and others 2005, Simon and others 2006) (Table 2). Variations of this protocol are also the basis for the Hofheim I and II CHOP-LAsp protocols used in this study.

Including a much larger number of dogs than all other studies on canine lymphoma published so far, this study could not demonstrate a significant difference in DFR and ST between dogs treated with a continuous versus discontinuous protocol. There was only a trend for an improved survival rate at one year in those dogs that had finished all cycles of the induction protocol and were continued on a maintenance protocol (70.5 per cent survival rate compared with 59 per cent of the dogs that were left without maintenance therapy). This trend may simply reflect the fact that dogs on a prolonged maintenance therapy remain in closer observation by an oncologist. Therefore, relapses may be detected earlier and treated more promptly, which eventually may have an influence on both the ST but also on the documentation of the duration of DFR.

The question of the optimal duration of a discontinuous protocol has yet to be answered. Total treatment duration of discontinuous protocols mostly ranges between 12 and 26 weeks (Chun and others 2000, Moore and others 2001, Garrett and

others 2002, Simon and others 2006). The protocol used for cohort 2 of the present study had a total duration of 28 weeks, which makes it one of the 'longer' protocols compared with other published protocols. It is therefore unknown if significantly shorter protocols would lead to the same results. Prolonged close monitoring of the dogs and counselling of the client by an oncology specialist may have an important influence on the performance of a protocol.

It has been hypothesised that protocols that include a maintenance phase with 'weaker' cytostatic drugs may actually promote the development of multidrug resistance, which may lead to a decreased ST in dogs treated with such protocols (Moore and others 1995, Moore and others 2001). This study's data do not support this hypothesis since maintenance therapy did not negatively influence the DFR and ST nor the duration of a second remission after reinduction of a relapsed lymphoma.

From a practical standpoint, a continuous chemotherapy protocol is associated with increased stress for the dog and higher treatment costs and may therefore affect owner compliance. Since maintenance chemotherapy seems of no additional benefit in canine multicentric lymphoma, discontinuous protocols should be favoured due to fewer hospital visits and lower treatment costs.

Dogs with T cell lymphoma have been reported to have a poorer prognosis in comparison to lymphoma of B cell phenotype (Moore and others 1994, Teske 1994, Teske and others 1994, Valerius and others 1997, Dobson and others 2001). Interestingly, the present study could not detect differences in DFR and ST between the two phenotypes. Unfortunately, immunophenotyping was only performed in 129 dogs, which limits the statistical power of this observation. Hypercalcaemia has been associated with the T cell phenotype (Greenlee and others 1990, Teske 1994, Teske and others 1994, Ernst and others 2015) and has therefore been associated with a poorer prognosis (Greenlee and others 1990, Teske 1994, Teske and others 1994, Valerius and others 1997). This study could not demonstrate a significant association between hypercalcaemia and DFR or ST in the 42 dogs in which hypercalcaemia was present.

In this study, there was a negative correlation between the application of lomustine in the induction protocol and ST. Dogs receiving lomustine for intensification of therapy during the first four cycles lived approximately 100 days shorter compared with dogs that did not require treatment intensification. Lomustine has been described as an effective agent in the treatment of relapsed lymphoma due to the lack of cross-resistance with other drugs (Moore and others 1999, Saba and others 2007). The authors believe that the shorter ST in dogs receiving lomustine is due to the fact that these cases clinically exhibited unstable or incomplete remissions and therefore it can be assumed that these lymphomas belonged to more aggressive subtypes. It has been demonstrated that certain subtypes of B cell and T cell lymphomas exhibit a more aggressive behaviour and therefore may result in differences in remission rates, DFR and ST (Ponce and others 2004, Valli and others 2013). Unfortunately, in this study no cytological subtyping of the lymphomas was performed, and therefore, the reasons for poor response in these cases could not be studied further.

Findings confirm previous results that glucocorticoid pretreatment is negatively correlated with ST (Price and others 1991, Vail and others 2001). Thrombocytopenia at the time of diagnosis was negatively correlated with ST in this study, which is in contrast to a positive correlation between thrombocytopenia ($<200,000$ cells/ μl) and ST seen previously (Garrett and others 2002). In another study, thrombocytopenia was a negative prognostic factor for DFR, but not for ST (Zemann and others 1998, Moore and others 2001). Bone marrow involvement of the tumour or immune-mediated mechanisms has been proposed as mechanisms for thrombocytopenia, which occur in conjunction with lymphomas (Madewell 1986, Moore and others 2001). Since bone marrow biopsies were not part of the work-up of dogs in this study, this assumption could not be tested.

TABLE 2: Overview of various CHOP-based protocols for the treatment of canine multicentric lymphoma

Authors	Duration of protocol (weeks)	n	Type of study		
			(SC/MC)	R/P	Control or comparison population
<i>Continuous protocols</i>					
Teske and others 1990	I: 14 weeks M: until relapse	62	SC	P	Cohort study (with and without L-asparaginase)
Stone and others 1991	I: 4 weeks M: up to 78 weeks	41	SC	P	COPA protocol (Cotter and Goldstein 1986)
Keller and others 1993	I: 9 weeks M: up to 168 weeks max	55	SC	P	Historical controls (literature data; Greenlee and others 1990, Stone and others 1991, etc)
Myers and others 1997	I: 4 weeks M: up to 78 weeks	68	SC	R	ACOPA I—Stone and others 1991
Zemann and others 1998	I: 12 weeks M: up to 78 weeks	98	MC	P	ACOPA II—Myers and others 1997
Kessler and Kandel 2004	I: 30 weeks M: until 2 years max	57	SC	R	Historical controls (literature data)
Siedlecki and others 2006	I: 9 weeks M: until 104 weeks	39	SC	R	Historical controls (literature data, especially UW-25; Chun and others 2000, Garrett and others 2002)
Hosoya and others 2007	I: 8 weeks M: until relapse	101	SC	R	COAP v UW-19
Simon and others 2008	I: 6 weeks M: up to 130 weeks	114	MC	R	Cohort study and historical controls (literature data)
Daters and others 2010	I: 18 weeks M: until 60 weeks	65	MC	P	Historical controls (literature data)
<i>Discontinuous protocols</i>					
Chun and others 2000	25	49	SC	P	Historical controls UW-Madison protocol with M (Vail and others 1996)
Moore and others 2001	15	82	SC	R	VELCAP-L (Zemann and others 1998)
Garrett and others 2002	25	53	SC	P	Historical controls UW-Madison protocol with M (Vail and others 1996)
MacDonald and others 2005	19	115	SC	R	Cohort study—historical controls (literature data)
Simon and others 2006	12	77	MC	P	Historical controls (literature data)
Sorenmo and others 2010	20	130	SC	R	UW-25 (Garrett and others 2002, Chun and others 2000)
Rebhuhn and others 2010	26	24	SC	R	MOPP (Rassnick and others 2002, Brodsky and others 2009)
Rassnick and others 2010	25	66	SC	P	Historical group (n=71) from same institution treated with an L-CHOP protocol
COPA, Cyclophosphamide, Vincristine, Prednisone, Doxorubicin; ACOPA, Prednisone, L-Asparaginase, Vincristine, Cyclophosphamide, Doxorubicin; UW, University of Wisconsin (L-Asparaginase, Vincristine, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Prednisone); VELCAP-L, Vincristine, L-Asparaginase, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Prednisone, plus maintenance phase (L = Long); COAP, Cyclophosphamide, Vincristine, Cytosine arabinoside, Prednisone; MOPP, Mechlorethamine, Vincristine, Procarbazine, Prednisone; L-CHOP, L-Asparaginase, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, Prednisone. I, induction; M, maintenance; MC, multicentre; n, patients; P, prospective; R, retrospective; SC, single centre.					

COPA, Cyclophosphamide, Vincristine, Prednisone, Doxorubicin; ACOPA, Prednisone, L-Asparaginase, Vincristine, Cyclophosphamide, Doxorubicin; UW, University of Wisconsin (L-Asparaginase, Vincristine, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Prednisone); VELCAP-L, Vincristine, L-Asparaginase, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Prednisone, plus maintenance phase (L = Long); COAP, Cyclophosphamide, Vincristine, Cytosine arabinoside, Prednisone; MOPP, Mechlorethamine, Vincristine, Procarbazine, Prednisone; L-CHOP, L-Asparaginase, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, Prednisone. I, induction; M, maintenance; MC, multicentre; n, patients; P, prospective; R, retrospective; SC, single centre.

Older age and substage b at the time of relapse was associated with a shorter ST in this study. Despite reaching statistical significance, this may simply reflect the owner's decision to euthanase the pet due to old age and/or reduced quality of life and may not be an independent prognostic factor.

Although dogs given either protocol were treated in the same institution, by the same clinicians, using the same induction protocol and despite the comparatively high number of cases, the study has several limitations. Any retrospective study is dependent on the quality and consistency of the documentation of the clinical information. In clinical studies, the outcome of therapy and ST of the patient may also strongly be influenced by external factors such as owner compliance and financial considerations. Since the present study spans a long time period, these two issues may become especially relevant.

In this study, remission status was documented using a rather subjective assessment of CR, PR or NR based on palpation findings of the peripheral lymph nodes. The adaptation of the RECIST criteria to haematopoietic tumours published in 2010 by Vail and others allows for a standardised assessment and documentation of remission status in patients with lymphoma. This system was not used in the present study since the inclusion of dogs was started long before publication of these RECIST adaptations, and therefore, it appeared not feasible to retrospectively apply these criteria. Another limitation of the study is the lack of cytological or flow cytometric subtyping and the limited T/B-immunophenotyping. Therefore, it is not possible to evaluate the effect of a continuous versus discontinuous protocol on the various subtypes of lymphoma.

Further randomised prospective studies with large case numbers are warranted to find the most effective treatment

duration for multicentric lymphoma in dogs. In the future, the choice of chemotherapy protocol may not only be influenced by histological and immunohistochemical subtype but also by cytomorphological characterisation or even genetic profiling of the tumour.

References

- BEHERA, M., KUMAR, A., SOARES, H. P., SOKOL, L. & DJULBEGOVIC, B. (2007) Evidence-based medicine for rare diseases: implications for data interpretation and clinical trial design. *Cancer Control* **14**, 160–166.
- BOYCE, K. L. & KITCHELL, B. E. (2000) Treatment of canine lymphoma with COPLA/IVP. *Journal of the American Animal Hospital Association* **36**, 395–403.
- BRODSKY, E. M., MAULDIN, G. N., LACHOWICZ, J. L. & POST, G. S. (2009) Asparaginase and MOPP treatment of dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **23**, 578–584.
- CARTER, R. E., HARRIS, C. K., WITHROW, S. J., VALLI, V. E. O. & SUSANECK, S. J. (1987) Chemotherapy of canine lymphoma with histopathological correlation: doxorubicin alone compared to COP as first treatment regimen. *Journal of the American Animal Hospital Association* **23**, 587–596.
- CHUN, R., GARRETT, L. D. & VAIL, D. M. (2000) Evaluation of a high-dose chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **14**, 120–124.
- COTTER, S. M. (1983) Treatment of lymphoma and leukemia with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone: II treatment of cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* **19**, 166–172.
- COTTER, S. M. & GOLDSTEIN, M. A. (1986) Comparison of two protocols for maintenance of remission in dogs with lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association* **23**, 495–499.
- DATERS, A. T., MAULDIN, G. E., MAULDIN, G. N., BRODSKY, E. M. & POST, G. S. (2010) Evaluation of a multidrug chemotherapy protocol with mitoxantrone based maintenance (CHOP-MA) for the treatment of canine lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology* **8**, 11–22.
- DOBSON, J. M., BLACKWOOD, L. B., MCINNES, E. E., BOSTOCK, D. E., NICHOLLS, P., HOATHER, T. M. & TOM, B. D. M. (2001) Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *Journal of Small Animal Practice* **42**, 377–384.

- ERNST, T., KESSLER, M., LAUTSCHAM, E., WILLIMZIG, L., NEIGER, R. (2016) Das multizentrische maligne Lymphom beim Hund—eine epidemiologische Studie mit 411 Patienten. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere Heimtiere* **17**, 245–251
- GARRETT, L. D., THAMM, D. H., CHUN, R., DUDLEY, R. & VAIL, D. M. (2002) Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **16**, 704–709
- GREENLEE, P. G., FILIPPA, D. A., QUIMBY, E. W., PATNAIK, A. K., CALVANO, S. E., MATUS, R. E., KIMMEL, M., HURVITZ, A. I. & LIEBERMAN, P. H. (1990) Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer* **66**, 480–490
- HAHN, K. A., RICHARDSON, A. C., TECLAW, R. E., CLINE, J. M., CARLTON, W. W., DENICOLA, D. B. & BONNEY, P. L. (1992) Is maintenance chemotherapy appropriate for the management of canine malignant lymphoma? *Journal of Veterinary Internal Medicine* **6**, 3–10
- HOSOYA, K., KISSEBETH, W. C., LORD, L. K., ALVAREZ, F. J., LARA-GARCIA, A., KOSAREK, C. E., LONDON, C. A. & COUTO, C. G. (2007) Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **21**, 1355–1363
- JAGIELSKI, D., LECHOWSKI, R., HOFFMANN-JAGIELSKA, M. & WINIARCZYK, S. (2002) A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998–2000). *Journal of Veterinary Internal Medicine Series A* **49**, 419–424
- JEFFREYS, A. B., KNAPP, D. W., CARLTON, W. W., THOMAS, R. M., BONNEY, P. L., DEGORTARI, A. & LUCROY, M. D. (2005) Influence of asparaginase on a combination chemotherapy protocol for canine multicentric lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association* **41**, 221–226
- KELLER, E. T., MACEWEN, E. G., ROSENTHAL, R. C., HELFAND, S. C. & FOX, L. E. (1993) Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **7**, 289–295
- KESSLER, M. & KANDEL, B. (2004) Chemotherapie des malignen Lymphoms beim Hund: Ergebnisse und Erfahrungen mit dem 'Hofheimer Protokoll' bei 57 Patienten. *Kleintierpraxis* **49**, 349–358
- KIUEPEL, M., TESKE, E. & BOSTOCK, D. (1999) Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Veterinary Pathology* **36**, 292–300
- MACDONALD, V. S., THAMM, D. H., KURZMAN, I. D., TUREK, M. M., VAIL, D. M. (2005) Does L-asparaginase influence efficacy or toxicity when added to a standard CHOP protocol for dogs with lymphoma? *Journal of Veterinary Internal Medicine* **19**, 732–736
- MADEWELL, B. R. (1986) Hematological and bone marrow cytological abnormalities in 75 dogs with malignant lymphomas. *Journal of the American Animal Hospital Association* **22**, 235–240
- MOORE, A. S., COTTER, S. M., RAND, W. M., WOOD, C. A., WILLIAMS, L. E., LONDON, C. A., FRIMBERGER, A. E. & L'HEUREUX, D. A. (2001) Evaluation of a discontinuous treatment protocol (VELCAP-S) for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **15**, 348–354
- MOORE, A. S., LEVEILLE, C. R., REIMANN, K. A., SHU, H. & ARIAS, I. M. (1995) The expression of p-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance. *Cancer Investigation* **13**, 475–479
- MOORE, A. S., LONDON, C. A., WOOD, C. A., WILLIAMS, L. E., COTTER, S. M., L'HEUREUX, D. A. & FRIMBERGER, A. E. (1999) Lomustine (CCNU) for the treatment of resistant lymphoma in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **13**, 395–398
- MOORE, A. S., OGILVIE, G. K., RUSLANDER, D., RAND, W. S., COTTER, S. M., GETZY, D. M., L'HEUREUX, D. A. & DENNIS, R. A. (1994) Evaluation of mitoxantrone for the treatment of lymphoma in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* **205**, 1903–1905
- MYERS, N. C. III, MOORE, A. S., RAND, W. M., GLIATTO, J. & COTTER, S. M. (1997) Evaluation of a multidrug chemotherapy protocol (ACOPA II) in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **11**, 333–339
- OWEN, L. N. (1980) *TNM Classification of Tumors in Domestic Animals*. Geneva, Switzerland: World Health Organization. pp 46–47
- PIEK, C. J., RUTTEMAN, G. R. & TESKE, E. (1999) Evaluation of the results of a L-asparaginase-based continuous chemotherapy protocol versus a short doxorubicin-based induction chemotherapy protocol in dogs with malignant lymphoma. *The Veterinary Quarterly* **21**, 44–49
- PONCE, E., MAGNOL, J. P., LEDIEU, D., MARCHAL, T., TURINELLI, V., CHALVET-MONFRAY, K. & FOURNEL-FLEURY, C. (2004) Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *The Veterinary Journal* **167**, 158–166
- PRICE, G. S., PAGE, R. L., FISCHER, B. M., LEVINE, J. E. & GERIG, T. M. (1991) Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **5**, 259–262
- RASSNICK, K. M., BAILEY, D. B., MALONE, E. K., INTILE, J. L., KISELOW, M. A., FLORY, A. B., BARLOW, L. L., BALKMAN, C. E., BARNARD, S. M. & WAITE, A. H. (2010) Comparison between L-CHOP and an L-CHOP protocol with interposed treatments of CCNU and MOPP (L-CHOP-CCNU-MOPP) for lymphoma in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology* **8**, 243–253
- RASSNICK, K. M., MAULDIN, G. E., AL-SARRAE, R., MAULDIN, G. N., MOORE, A. S. & MOONEY, S. C. (2002) MOPP chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs: a retrospective study of 117 cases (1989–2000). *Journal of Veterinary Internal Medicine* **16**, 576–580
- REBHUN, R. B., KENT, M. S., BORROFKA, S., FRAZIER, S., SKORUPSKI, K. & RODRIGUEZ, C. O. (2011) CHOP chemotherapy for the treatment of canine multicentric T-cell lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology* **9**, 38–44
- SABA, C. E., THAMM, D. H. & VAIL, D. M. (2007) Combination chemotherapy with L-asparaginase, lomustine, and prednisone for relapsed or refractory canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **21**, 127–132
- SAUERBREY, M. L., MULLINS, M. N., BANNINK, E. O., VAN DORE, T. E., KANEENE, J. B. & OBRADOVICH, J. E. (2007) Lomustine and prednisone as a first-line treatment for dogs with multicentric lymphoma: 17 cases (2004–2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **230**, 1866–1869
- SIEDLECKI, C. T., KASS, P. H., JAKUBIAK, M. J., DANK, G., LYONS, J. & KENT, M. S. (2006) Evaluation of an actinomycin-D-containing combination chemotherapy protocol with extended maintenance therapy for canine lymphoma. *The Canadian Veterinary Journal* **47**, 52–59
- SIMON, D. (2010) Effektivität und Verträglichkeit von Chemotherapien bei Tumorerkrankungen von Hund und Katze und Untersuchungen zu Zytostatikarückständen in Serum und Urin des Hundes. Habilitation Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover
- SIMON, D., MORENO, S. N., HIRSCHBERGER, J., MORITZ, A., KOHN, B., NEUMANN, S., JURINA, K., SCHARVOGEL, S., SCHWEDES, S., REINACHER, M., BEYERBACH, M. & NOLTE, I. (2008) Efficacy of a continuous, multiagent chemotherapy protocol versus a short-term single-agent protocol in dogs with lymphoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **232**, 879–885
- SIMON, D., NOLTE, I., EBERLE, N., ABBREDETERIS, N., KILLICH, M. & HIRSCHBERGER, J. (2006) Treatment of dogs with lymphoma using a 12-week, maintenance-free combination chemotherapy protocol. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **20**, 948–954
- SORENMO, K., OVERLEY, B., KRICK, E., FERRERA, T., LABLANC, A. & SHOFER, E. (2010) Outcome and toxicity associated with a dose-intensified, maintenance-free CHOP-based chemotherapy protocol in canine lymphoma: 130 cases. *Veterinary and Comparative Oncology* **8**, 196–208
- STONE, M. S., GOLDSTEIN, M. A. & COTTER, S. M. (1991) Comparison of two protocols for the induction of remission in dogs with lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association* **27**, 315–321
- TESKE, E. (1994) Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *The Veterinary Quarterly* **16**, 209–219
- TESKE, E., HEERDE, P., RUTTEMAN, G. R., KURZMAN, I. D., MOORE, P. E. & MACEWEN, E. G. (1994) Prognostic factors in canine non-hodgkin's lymphomas. A prospective study in 138 dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **205**, 1722–1728
- TESKE, E., RUTTEMAN, G. R., VAN HEERDE, P. & MISDORF, W. (1990) Polyethylene glycol-L-asparaginase versus native L-asparaginase in canine non-Hodgkin's lymphoma. *European Journal of Cancer* **26**, 891–895
- VAIL, D. M., KISSEBETH, W. C., OBRADOVICH, J. E., MOORE, F. M., LONDON, C. A., MACEWEN, E. G. & RITTER, M. A. (1996) Assessment of potential doubling time (Tpot), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma. *Experimental Hematology* **24**, 807–815
- VAIL, D. M., MACEWEN, E. G. & YOUNG, K. (2001) Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In *Small Animal Clinical Oncology*. 3rd edn. Eds S. J. WITHROW & E. G. MACEWEN. Philadelphia: Academic Press. pp 558–590
- VAIL, D. M., MICHELS, G. M., KHANNA, C., SELTING, K. A. & LONDON, C. A. (2010) Response evaluation criteria for peripheral nodal lymphoma in dogs (v1.0) —a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Veterinary and Comparative Oncology* **8**, 28–37
- VALERIUS, K. D., OGILVIE, G. K., MALLINCKRODT, C. H. & GETZY, D. M. (1997) Doxorubicin alone or in combination with asparaginase, followed by cyclophosphamide, vincristine, and prednisone for treatment of multicentric lymphoma in dogs: 121 cases (1987–1995). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **210**, 512–516
- VALLI, V. E., KASS, P. H., SAN MYINT, M. & SCOTT, F. (2013) Canine lymphomas: Association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Veterinary Pathology* **50**, 738–748
- VETERINARY CO-OPERATIVE ONCOLOGY GROUP (2004) Veterinary Co-operative Oncology Group—common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0. *Veterinary and Comparative Oncology* **2**, 194–213
- ZEMANN, B. I., MOORE, A. S., RAND, W. M., MASON, G., RUSLANDER, D. M., FRIMBERGER, A. E., WOOD, C. A., L'HEUREUX, D. A., GLIATTO, J. & COTTER, S. M. (1998) A combination chemotherapy protocol (VELCAP-L) for dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **12**, 465–470



3.2 Publikation 2

Das multizentrische Lymphom bei 411 Hunden – eine epidemiologische Studie

Theresa Ernst¹; Martin Kessler²; Esther Lautscham²; Lisanne Willimzig²; Reto Neiger³

¹Tierarztpraxis Dr. Ernst, Stuttgart; ²Tierklinik Hofheim, Hofheim; ³Klinik für Kleintiere, Justus-Liebig-Universität Gießen

Schlüsselwörter

Rasseprädisposition, Hyperkalzämie, T-Zell-Lymphom, Referenzpopulation

Zusammenfassung

Ziel: Überblick über die epidemiologische Situation des multizentrischen Lymphoms (ML) des Hundes in Deutschland. **Material und Methoden:** 411 Hunde mit ML wurden retrospektiv hinsichtlich Rasse, Alter, Geschlecht, Körpergewicht und des Anteils der Hunde mit Hyperkalzämie bzw. T- und B-Zell-Lymphom ausgewertet und statistisch mit zwei Vergleichspopulationen verglichen (Klinikpopulation Tierklinik Hofheim, n = 52 142; krankenversicherte Hunde, n = 123 423). **Ergebnisse:** 298 (72,5%) der 411 Hunde gehörten 86 verschiedenen Rassen an, 113 (27,5%) waren Mischlinge. Bei Gegenüberstellung mit beiden Vergleichspopulationen zeigte sich übereinstimmend eine Rasseprädisposition für American Pitbull Terrier (Quotenverhältnis [QV] 5,2 bzw. 18,5), American Staffordshire Terrier (QV 3,3 bzw. 4,6), Briard (QV 5,6 bzw. 9,5), Bullmastiff (QV 7,8 bzw. 5,0), Irish Setter (QV 3,3 bzw. 4,1) und Rottweiler (QV 2,8 bzw. 3,6). Golden Retriever (n = 22, QV 1,3 bzw. 0,9) und Berner Sennenhunde (n = 22, QV 2,4 bzw. 2,0) waren in absoluten Zahlen häufig vertreten, doch ergab sich beim Vergleich mit den Vergleichspopulationen lediglich ein QV < 3. Das durchschnittliche Körpergewicht betrug 30,2 ± 13,7 kg, nur 75 (18%) Hunde wogen weniger als 15 kg. Bei den kleineren Hunden (< 15 kg KM) waren West Highland White Terrier (n = 12) gehäuft vertreten. Das mittlere Alter der Hunde lag bei 7,9 ± 2,7 Jahren. Hunde ≥ 15 kg waren signifikant (p < 0,001) jünger (7,6 ± 2,4 Jahre) als Hunde < 15 kg (9,3 ± 3,2 Jahre). Hunde mit B-Zell-Lymphom hatten ein signifikant (p < 0,001) höheres Alter (8,5 ± 2,6 Jahre) als Hunde mit T-Zell-Lymphom (6,4 ± 1,8 Jahre). Eine Geschlechtsprädisposition ließ sich nicht nachweisen (54% männlich, 46% weiblich). Eine paraneoplastische Hyperkalzämie als Zeichen eines T-Zell-Lymphoms lag bei 44 (11,4%) Hunden vor. 20,6% bzw. 79,4% der Hunde wiesen einen T- bzw. B-Zell-Immunphänotyp auf. **Klinische Relevanz:** Bereits bekannte Rasseprädispositionen konnten bestätigt und bislang unbekannte Rassehäufungen identifiziert werden (Briard, West Highland White Terrier, Irish Setter). Bei kleineren Hunden (< 15 kg) tritt das ML in deutlich höherem Alter auf.

Keywords

Breed predisposition, hypercalcaemia, T-cell lymphoma, reference population

Summary

Objective: To provide an overview of the epidemiology of canine multicentric lymphoma in Germany. **Material and methods:** A total of 411 dogs with multicentric malignant lymphoma were retrospectively analysed regarding breed, age, sex, weight and the number of animals dogs with hypercalcaemic lymphoma and B-/T-immunophenotype, and compared to two reference populations (total own clinic population, n = 52 142; dogs with health insurance in Germany, n = 123 423). **Results:** In total, 298 (72.5%) of the 411 dogs belonged to 86 different breeds, while 113 (27.5%) dogs were mixed breed. In comparison to both reference populations, a breed predisposition for the American Pitbull Terrier (odds ratio [OR] 5.2 and 18.5), American Staffordshire Terrier (OR 3.3 and 4.6), Briard (OR 5.6 and 9.5), Bullmastiff (OR 7.8 and 5.0), Irish Setter (OR 3.3 and 4.1) and Rottweiler (OR 2.8 and 3.6) was found. Golden Retrievers (n = 22, OR 1.3 and 0.9) and Bernese Mountain Dogs (n = 22, OR 2.4 and 2.0) were frequently affected in absolute numbers, but when compared to the reference populations an OR < 3 was detected. Mean body weight was 30.2 ± 13.7 kg; only 75 (18%) dogs weighed < 15 kg. Amongst the small dogs (< 15 kg), there was a large number of West Highland White Terriers (n = 12). Mean age of the dogs with lymphoma was 7.9 ± 2.7 years. Dogs weighing ≥ 15 kg were significantly (p < 0.001) younger (7.6 ± 2.4 years) compared to dogs weighing < 15 kg (9.3 ± 3.2 years). Dogs with a B-cell immunophenotype (8.5 ± 2.6 years) were significantly older compared to dogs with a T-cell immunophenotype (6.4 ± 1.8 years) (p < 0.001). There was no gender predisposition (54% male, 46% female). Hypercalcaemia as an indicator of T-cell lymphoma was present in 44 (11.4%) of the dogs. A T-cell and B-cell immunophenotype was found in 20.6% and 79.4% of the dogs, respectively. **Clinical relevance:** This study confirms previous data about breed predispositions for canine malignant multicentric lymphoma and demonstrates that further breeds are predisposed (Briard, West Highland White Terrier, Irish Setter). Small-breed dogs (< 15 kg BM) appear to be affected with lymphoma at a greater age.

Korrespondenzadresse

Tierarztpraxis Dr. Ernst
Dr. Theresa Ernst
Birkenwaldstraße 214
70191 Stuttgart
E-Mail: theresa_ernst@hotmail.com

Multicentric lymphoma in 411 dogs – an epidemiological study

Tierärztl Prax 2016; 44 (K): 245–251
<http://dx.doi.org/10.15654/TPK-150338>
Eingegangen: 17. Mai 2015
Akzeptiert nach Revision: 15. September 2015
Epub ahead of print: 25. April 2016

Einleitung

Die verhältnismäßig kleinen genetischen Pools der heutigen Rassehundezucht führen zu einer Zunahme vererbter genetischer Defekte, die sich unter anderem in Tumorerkrankungen manifestieren (3, 32, 35). Kommen Zuchtrüden mit einer genetischen Prädisposition für eine bestimmte Tumorerkrankung in einzelnen Ländern vermehrt zum Einsatz, kann es bei den jeweiligen Rassen zu familiären und geographischen Häufungen von Tumorerkrankungen kommen. Aber auch äußere Einflüsse, wie länderspezifische Fütterungsgewohnheiten oder die Exposition gegenüber Toxinen, können zu einer unterschiedlichen Inzidenz bestimmter Tumoren in einzelnen Ländern führen (12, 13, 20). Für das Non-Hodgkin-Lymphom des Menschen wurden in aktuellen Übersichtsarbeiten die genetischen und äußeren Einflüsse dargestellt, die geographische Unterschiede in der Erkrankungsinzidenz zur Folge haben können (3, 30). Für das maligne Lymphom des Hundes liegen vergleichsweise wenige Untersuchungen in Bezug auf Rasseprädispositionen vor, obwohl aufgrund der kleineren genetischen Pools die genetische Penetranz von Erbkrankheiten größer ist als beim Menschen (35).

Beim Hund manifestiert sich das maligne Lymphom rasseübergreifend am häufigsten als multizentrische Form. Seine Inzidenz zeigt länderspezifische Unterschiede und beträgt je nach Untersuchung 13 (Skandinavien), 24 (USA), 33 (Niederlande) bzw. 114 Tiere pro 100000 Hunde (Großbritannien) (1, 6, 7, 33). Aktuelle epidemiologische Studien zum Lymphom des Hundes unter Einbeziehung einer Vergleichspopulation beschränken sich auf Großbritannien. Dobson et al. (6) werteten eine Population von 130684 krankenversicherten Hunden hinsichtlich des Auftretens von Tumorerkrankungen aus. Die 114 identifizierten Hunde mit multizentrischem Lymphom wurden hinsichtlich Rasseprädispositionen untersucht. Boxer, Bulldoggen und Bullmastiffs zeigten sich im Vergleich zur Vergleichspopulation (alle krankenversicherten Hunde) als signifikant häufiger betroffen (9). In anderen Studien werden allgemein mittlere bis große Hunderassen sowie im Speziellen Boxer, Rottweiler und Golden Retriever als prädisponiert beschrieben, entweder gänzlich ohne Vergleichspopulation oder unter Verwendung der Gesamtklinikpopulation als Bezugsgröße (1, 7, 20, 26, 27, 33, 38). Für Deutschland liegen bislang keine systematischen Untersuchungen zur Epidemiologie des malignen Lymphoms des Hundes vor.

Ziel der vorliegenden Studie war, für das maligne Lymphom des Hundes in Deutschland Grundlagen zu Rasseprädispositionen, Alters- und Geschlechtsverteilung, zur Prävalenz der paraneoplastischen Hyperkalzämie sowie zu Rassehäufungen im Hinblick auf T-/B-Immunphänotypen zu ermitteln und diese mit den Studienergebnissen aus anderen Ländern zu vergleichen. Als Bezugsgrößen sollten erstmalig zwei Vergleichspopulationen (krankenversicherte Hunde und Gesamtpopulation einer Tierklinik) dienen und somit auch ein Vergleich verschiedener häufig verwendeter Bezugspopulationen ermöglicht werden.

Epidemiologische Daten können sowohl für die Klinik als auch für die Grundlagenforschung zur Erblichkeit von Erkrankungen von Bedeutung sein. Durch die Darstellung bislang unbekannter Rasse-

prädispositionen ließe sich möglicherweise bei einzelnen Patienten ein früherer Diagnosezeitpunkt und Therapiebeginn erreichen und somit die Prognose verbessern. Darüber hinaus könnten die Erkenntnisse Grundlage dafür sein, bei als prädisponiert erkannten Rassen die mit der Erkrankung assoziierten genetischen Mutationen zu identifizieren. Zukünftig könnten nach Entwicklung genetischer Tests Merkmalsträger frühzeitig von der Zucht ausgeschlossen bzw. bei betroffenen Tieren durch gezielte Vorsorgemaßnahmen die Manifestierung der Erkrankung in frühen Stadien erkannt werden.

Material und Methoden

Retrospektiv wurden alle Hunde erfasst, bei denen im Zeitraum von 1997 bis 2011 in der Tierklinik Hofheim ein multizentrisches Lymphom diagnostiziert wurde und die eine chemotherapeutische Behandlung erhielten. Die Diagnosestellung erfolgte anhand zytologischer oder histologischer Untersuchung vergrößerter peripherer Lymphknoten. Ausgewertete Parameter waren Rasse, Alter, Gewicht, Geschlecht, das Vorliegen einer Hyperkalzämie sowie, falls vorhanden, die Ergebnisse der immunhistologischen Differenzierung in T- und B-Zell-Lymphom.

Als Vergleich dienten zwei Populationen: zum einen alle Hunde, die in der Tierklinik Hofheim im gleichen Untersuchungszeitraum vorgestellt wurden (Klinikpopulation: $n = 52142$), zum anderen die Gesamtheit aller im Untersuchungszeitraum bei drei der vier führenden Haustierversicherungen in Deutschland versicherten Hunde (Versicherungspopulation: $n = 123423$).

Nach Überprüfung sämtlicher Daten auf Normalverteilung wurden kontinuierliche Daten (Alter, Gewicht) zwischen zwei Gruppen mittels t-Test und ordinale Daten (Geschlecht, Rasse etc.) mittels Chi-Quadrat-Test verglichen. Da alle Daten normalverteilt waren, wurden parametrische Tests gewählt. Von kontinuierlichen Daten wurden Mittelwert und Standardabweichung ermittelt. Die Berechnung erfolgte mittels kommerzieller Statistiksoftware (SPSS, Version 22). Ein p -Wert $< 0,05$ galt als signifikant. Die Quotenverhältnisse (Odds Ratio) wurden als Risikoschätzung berechnet, bei dem die einzelne Rasse gegen alle Rassen außer dieser verglichen wurde.

Ergebnisse

Bei 113 (27,5%) der 411 Hunde mit Lymphom handelte es sich um Mischlinge, die übrigen 298 Hunde (72,5%) gehörten 86 unterschiedlichen **Rassen** an. Die Verteilung der unter den Lymphompatienten sowie in den beiden Vergleichspopulationen am häufigsten vertretenen Rassen sowie das Quotenverhältnis (Odds Ratio) im Vergleich zur Klinik- und Versicherungspopulation ist ► Tab. 1 zu entnehmen.

Das durchschnittliche **Körpergewicht** der Hunde mit Lymphom betrug $30,2 \pm 13,7$ kg (Median 30,8 kg). Nur 75 (18%) Hunde wogen unter 15 kg. Bei diesen kleinen Hunden war der West

Tab. 1 Rasseverteilung der Hunde mit Lymphom im Vergleich zu den beiden Vergleichspopulationen (Klinikpopulation und Versicherungspopulation) sowie Angabe der jeweiligen Quotenverhältnisse

Table 1 Breed distribution of dogs with lymphoma in comparison to the clinic population and the population with health insurance, including odds ratios.

Rasse (nach Anzahl)	Lymphom- patienten		Klinikpopulation			Versicherungspopulation		
	n	%	n	%	OR (95%-KI)	n	%	OR (95%-KI)
Gesamt	411		52142			123423		
Mischling	113	27,5	14234	27,5	1 (0,8–1,2)	23867	19,3	1,6 (1,3–2,0)
Golden Retriever	25	6,1	2544	4,9	1,3 (0,8–1,9)	8306	6,7	0,9 (0,6–1,4)
Rottweiler	23	5,6	1090	2,1	2,8 (1,8–4,2)	1975	1,6	3,6 (2,4–5,6)
Berner Sennenhund	22	5,4	1260	2,4	2,4 (1,6–3,6)	3620	2,9	2,0 (1,3–3,0)
West Highland White Terrier	12	2,9	1343	2,6	1,1 (0,6–2,0)	1500	1,2	2,5 (1,4–4,4)
American Staffordshire Terrier	11	2,7	424	0,8	3,3 (1,8–6,1)	741	0,6	4,6 (2,5–8,3)
Briard	11	2,7	254	0,5	5,6 (3,0–10,6)	355	0,3	9,5 (5,2–17,5)
Labrador Retriever	10	2,4	2729	5,3	0,5 (0,2–0,8)	14831	12,0	0,2 (0,1–0,3)
Deutscher Schäferhund	9	2,2	2455	4,7	0,5 (0,2–0,9)	5154	4,2	0,5 (0,3–1,0)
Australian Shepherd	8	1,9	377	0,7	2,7 (1,3–5,5)	2770	2,2	0,9 (0,4–1,7)
Jack Russell Terrier	7	1,7	1163	2,2	0,8 (0,4–1,6)	4579	3,7	0,5 (0,2–1,0)
American Pitbull Terrier	6	1,5	148	0,3	5,2 (2,3–11,8)	99	0,1	18,5 (8,1–42,3)
Boxer	6	1,5	1035	2,0	0,7 (0,3–1,6)	3002	2,4	0,6 (0,3–1,3)
Irish Setter	6	1,5	231	0,4	3,3 (1,5–7,5)	440	0,4	4,1 (1,8–9,3)
Rauhaardackel	6	1,5	908	1,8	0,8 (0,4–1,9)	248	0,2	7,4 (3,3–16,6)
Rhodesian Ridgeback	6	1,5	581	1,1	1,3 (0,6–2,9)	2779	2,3	0,6 (0,3–1,4)
Tibet Terrier	6	1,5	341	0,7	2,2 (1,0–5,0)	626	0,5	2,9 (1,3–6,5)
Border Collie	5	1,2	555	1,1	1,1 (0,5–2,8)	1671	1,4	0,9 (0,4–2,2)
Cairn Terrier	5	1,2	198	0,4	3,2 (1,3–7,8)	341	0,3	4,5 (1,8–10,8)
Riesenschnauzer	5	1,2	335	0,6	1,9 (0,8–4,6)	563	0,5	2,7 (1,1–6,5)
Bullmastiff	3	0,7	49	0,1	7,8 (2,4–25,0)	179	0,1	5,0 (1,6–15,9)

OR = Odds Ratio; 95%-KI = 95%-Konfidenzintervall

Highland White Terrier (n = 12; 2,9% aller Hunde, 16,7% aller Hunde < 15 kg) am häufigsten vertreten, gefolgt vom Jack Russell Terrier (n = 7; 1,7% aller Hunde, 9,7% aller Hunde < 15 kg). Da das Gewicht der Hunde der Vergleichspopulationen nicht vorlag, konnte hinsichtlich der Häufung der beiden Rassen in der Gewichtskategorie < 15 kg keine Aussage über eine Signifikanz getroffen werden.

Das **Geschlechterverhältnis** der Hunde mit Lymphom stimmte mit dem der Klinikpopulation überein und war nahezu ausgeglichen: 225 bzw. 28394 männlich (54%, davon 75 [18%] bzw. 8069 [28%] kastriert) und 186 bzw. 23748 weiblich (46%, davon 89 [22%] bzw. 10888 [46%] kastriert). Hieraus ergab sich ein Anteil 40% kastrierter Hunde mit Lymphom gegenüber 36% kastrierter Hunde in der Klinikpopulation, was aber nicht signifikant voneinander abwich (p = 0,1). Bei der Versicherungspopulation fehlten Angaben zum Geschlecht.

Das durchschnittliche **Alter** der Hunde mit Lymphom betrug $7,9 \pm 3,2$ Jahre (Median 8,1 Jahre) (► Abb. 1). Im Vergleich zur Gesamtpopulation wurde der West Highland White Terrier mit einem signifikant (p < 0,001) höheren ($11,4 \pm 1,7$ Jahre) und der Australian Shepherd mit einem signifikant (p = 0,004) niedrigeren Alter ($5,4 \pm 2,1$ Jahre) vorgestellt. (► Tab. 2). Bei Gegenüberstellung der Hunde mit **B- und T-Zell-Lymphom** war eine statistisch signifikante Differenz von 2,1 Jahren festzustellen ($8,5 \pm 2,6$ vs. $6,4 \pm 1,8$ Jahre; p < 0,001) (► Tab. 2).

Bei 385 (94%) Hunden wurde zum Zeitpunkt der Vorstellung die Serumkonzentration von Gesamtkalzium bestimmt, wobei 44 (11%) von ihnen eine **Hyperkalzämie** (durchschnittlich $3,56 \pm 0,35$ mmol/l) aufwiesen. Die bei 12 dieser Hunde vorgenommene Immuntypisierung des Lymphoms ergab in allen Fällen ein T-Zell-Lymphom. Unter den Hunden mit Hyperkalzämie waren folgende Rassenhäufungen erkennbar: Von den insgesamt acht Australian

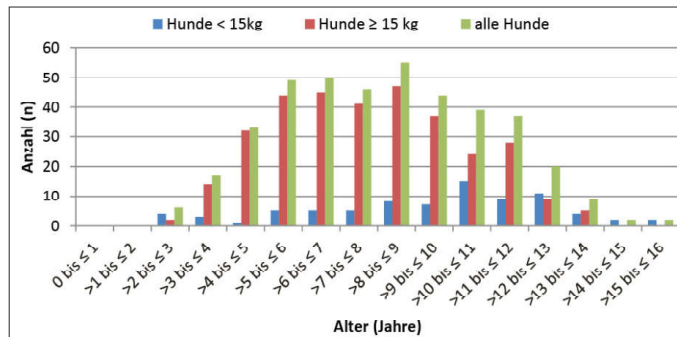


Abb. 1

Altersverteilung der Hunde mit Lymphom

Fig. 1

Age distribution of dogs with lymphoma.

Shepherds der Studie wiesen fünf eine Hyperkalzämie auf (bei drei von ihnen wurde immunhistochemisch ein T-Zell-Lymphom bestätigt). Ebenso zeigten drei der jeweils sechs Boxer und Rhodesian Ridgebacks eine Hyperkalzämie mit immunhistochemischem Nachweis eines T-Zell-Lymphoms in einem bzw. drei Fällen.

Insgesamt wurden 131 der 411 Lymphome **immunhistochemisch** phänotypisiert. Dabei ergab sich ein Verhältnis von 27 (20,6%) T-Zell- zu 104 (79,4%) B-Zell-Lymphomen.

Diskussion

Bei der Ermittlung epidemiologischer Daten muss durch Verwendung einer Vergleichspopulation eine Beeinflussung und potenzielle Verfälschung der Ergebnisse durch häufiger vertretene Rassen in der Gesamtpopulation möglichst gering gehalten werden. Die Nutzung der gesamten Population einer Institution als Vergleichspopulation ist in der Tiermedizin weit verbreitet (17, 33, 40), ihre Zu-

Tab. 2

Alters- und Geschlechtsverteilung einzelner Rassen von Hunden mit Lymphom (n = 410)

Table 2

Age and gender distribution of some breeds of dogs with lymphoma (n = 410).

Rasse	Anzahl	Alter		Geschlecht			
		Mittelwert	Median	m	mk	w	wk
Gesamt	411	7,9	7,9	150	75	97	89
Mischling	113	8,5	8,5	28	26	27	32
Golden Retriever	25	8,3	8,3	9	4	5	7
Rottweiler	22	7,1	6,5	9	4	5	5
Berner Sennenhund	22	6,7	6,6	13	2	4	3
West Highland White Terrier	12	11,4	11,1	4	1	6	1
American Staffordshire Terrier	11	9,9	10,4	2	3	1	4
Briard	11	7,1	6,8	2	1	6	2
Labrador Retriever	10	6,6	5,7	2	2	4	1
Deutscher Schäferhund	9	7,7	7,7	4	1	1	4
Australian Shepherd	8	5,4	4,9	5	1	2	0
Jack Russell Terrier	7	9,3	10,8	3	1	1	2
American Pit Bull Terrier	6	8	7,7	1	1	1	1
Boxer	6	7,3	6,8	3	1	0	2
Rauhaardackel	6	10,8	11,9	1	1	1	3
Rhodesian Ridgeback	6	6	5,9	2	1	2	1
Gewichtsklasse < 15 kg	75	9,3	10,1	24	12	23	16
Gewichtsklasse ≥ 15 kg	336	7,6	7,6	127	63	74	71
B-Zell-Lymphom	104	8,5	8,5	27	22	21	32
T-Zell-Lymphom	27	6,4	6,5	15	4	5	3

m = männlich, mk = männlich-kastriert, w = weiblich, wk = weiblich-kastriert

sammensetzung wird jedoch stark vom Tätigkeitsgebiet einer Klinik beeinflusst. Sie stellt somit keinen repräsentativen Querschnitt durch die Rasseverteilung der Hunde einer Region oder eines Landes dar. Verwendet man als Vergleichspopulation die Gruppe der krankenversicherten Hunde eines Landes (Versicherungspopulation), zeichnet sich diese im Gegensatz zur Klinikpopulation grundsätzlich durch eine (zum Zeitpunkt des Versicherungsabschlusses) Grundgesamtheit gesunder Hunde aus. Egenvall et al. (9) zeigten, dass die Population krankenversicherter Hunde einem repräsentativen Querschnitt durch die Hundepopulation und deren Rasseverteilung in einem Land nahekommt. Berücksichtigt werden muss jedoch, dass Haustierversicherungen in skandinavischen Ländern und Großbritannien flächendeckend verbreitet sind, während dies für Deutschland nicht zutrifft. Hier ist nur ein Bruchteil der Haustiere versichert, weshalb die Versichertenpopulation die Haustierpopulation nicht vollständig repräsentieren dürfte. So könnte die finanzielle Situation der Versicherungsnehmer oder eine Überrepräsentation bestimmter „krankheitsanfälliger“ Rassen zu Abweichungen in Bezug auf die Repräsentativität einer Versicherungspopulation führen. Hinsichtlich des gehäufte Vorkommens einzelner Rassen muss zudem der lange Untersuchungszeitraum in Betracht gezogen werden. Regelmäßige, durch aktuelle Trends („Moderasen“) bedingte Fluktuationen der Rasseverteilung werden allerdings durch die große Zeitspanne relativiert. Die vorliegende Studie verwendete für die Bestimmung der Rasseprädispositionen erstmals beide Vergleichspopulationen als Bezugsgröße. Bei der Gegenüberstellung beider Vergleichspopulationen zeigte sich eine überraschend hohe Übereinstimmung. Dies bedeutet, dass für epidemiologische Untersuchungen auch eine Klinikpopulation trotz ihrer Limitierungen eine probate Vergleichspopulation darstellt.

Bei der Betrachtung der absoluten Häufigkeiten einzelner Rassen in der Studienpopulation (Patienten mit Lymphom) stimmt deren Verteilung weitestgehend mit früheren Angaben aus der Literatur überein (1, 7, 17, 18, 23, 24, 33). Die Gegenüberstellung zu den beiden Vergleichspopulationen ergab allerdings andere Schwerpunkte. Hier erwies sich der Bullmastiff als stark prädisponiert, beim Vergleich zur Klinikpopulation sogar mit höchstem Quotenverhältnis von allen Hunderassen. Hinweise auf eine Prädisposition dieser Rasse sind in der Literatur weit verbreitet (7, 8, 10, 23, 26, 27), sodass von einer weltweit erhöhten Prädisposition ausgegangen werden kann. Auch für den American Pitbull Terrier und den American Staffordshire Terrier ließ sich gegenüber beiden Vergleichspopulationen eine statistisch signifikante Prädisposition nachweisen. Zusammen mit dem Bullterrier und dem Bullmastiff zeigten folglich vier Rassen, die von der Englischen Bulldogge als gemeinsamem Vorfahren abstammen, eine Prädisposition für die Erkrankung. Dies macht für deren Neigung zur Bildung eines Lymphoms phylogenetisch ältere Gendefekte wahrscheinlich. Im Gegensatz hierzu war der ebenfalls mit der Englischen Bulldogge verwandte Boxer in unserer Studie weder vermehrt noch signifikant gehäuft vertreten, obgleich ihm in der Vergangenheit wiederholt eine Prädisposition für die Erkrankung attestiert wurde (1, 7, 8, 25–27, 33). Gründe für diesen Unterschied

erschließen sich nicht, zumal der Boxer in Deutschland eine durchaus populäre Rasse darstellt.

Der Irish Setter zeigte sich im Vergleich zu den Referenzpopulationen jeweils an vierter Stelle hinsichtlich des Quotenverhältnisses (QV 3,3 bzw. 4,2). Eine Prädisposition konnte bereits in einer epidemiologischen Studie aus Frankreich gezeigt werden (24).

Der West Highland White Terrier war in der vorliegenden Studie nicht nur insgesamt die am vierthäufigsten vertretene Hunderrasse, sondern hatte mit 16,7% aller Hunde der Gewichtskategorie < 15 kg auch einen deutlich erhöhten Anteil in dieser insgesamt nur 18% aller Hunde umfassenden Gruppe. Ähnliche Ergebnisse zeichneten sich bereits in einer früheren Studie der Tierklinik Hofheim ab (57 Hunde, keine Referenzpopulation) (18). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen schien die Rasse in einer Studie aus Großbritannien nicht überproportional vertreten (8). Auch in einer amerikanischen Studie erkrankte der West Highland White Terrier nicht überproportional häufig an einem Lymphom (17).

Bemerkenswert war in unserer Studie das gehäufte Vorkommen des Briard in Relation zur Klinik- und Versicherungspopulation (jeweils an zweiter Stelle). In keinen anderen Untersuchungen, die sich auf Klinik-, Versicherungspopulationen oder Angaben von Zuchtverbänden beziehen, wird von einem gehäufte Auftreten des Lymphoms bei dieser Rasse berichtet (8, 34, 39, 40). Wird ein vermehrtes Auftreten der Rasse erwähnt, dann ohne Bezugnahme auf eine Referenzpopulation (17). Die starke Prädisposition des Briard in der untersuchten Population (Quotenverhältnis je nach Vergleichspopulation 5,6 bzw. 9,6) könnte in Anbetracht der in Deutschland verhältnismäßig geringen Verbreitung der Rasse auf eine geographisch umgrenzte Prädisposition hinweisen und sollte anhand der Stammbäume einzelner Zuchtrüden weiter untersucht werden.

Eine hohe Prävalenz des Lymphoms beim Golden Retriever ist bekannt (22, 27, 39, 40). Diese Ergebnisse müssen jedoch in Relation zu der hohen Popularität bzw. weiten Verbreitung dieser Rasse im Bezug zur Gesamtpopulation betrachtet werden. Da frühere Untersuchungen teilweise ohne Vergleichspopulationen durchgeführt wurden, sind deren Aussagen zur Rasseprädisposition des Retrievers nur bedingt aussagekräftig (22, 26). Lediglich in einer amerikanischen Studie wurden die Fallzahlen in Bezug zur Gesamtpopulation einer Klinik gesetzt und ein signifikant höheres Erkrankungsrisiko festgestellt (40). Im Gegensatz dazu ließ sich in der vorliegenden Studie in Relation zur Versicherungspopulation keine signifikante Häufung des Retrievers nachweisen und auch in Relation zur Klinikpopulation war die Häufung nur gering (Quotenverhältnis 1,3). Zum gleichen Resultat kam eine Untersuchung aus Schweden, in der sich unter Nutzung der Daten des schwedischen Rassehundclubs als Referenzpopulation bei den Hunden mit Lymphom keine signifikante Häufung des Golden Retrievers ergab (39).

Das gehäufte Vorkommen des in unseren Untersuchungen drittplatzierten Rottweilers bestätigt sich ebenfalls in der Literatur (16, 34). Hier zeigte sich jedoch, dass im Verhältnis zur hohen Popularität der Rasse in unserer Studie lediglich beim Vergleich mit der Versicherungspopulation eine Rasseprädisposition (Quotenverhältnis

> 3) darstellbar war. Bezogen auf die Klinikpopulation konnte in einer niederländischen Studie bei einer Rottweilerfamilie ein gehäuftes Auftreten von Lymphomen aufgezeigt werden (34). In einer Studie aus Polen waren 12 der 63 an einem Lymphom erkrankten Hunde Rottweiler, allerdings wurden diese Zahlen nicht in Relation zu einer Referenzpopulation gesetzt (16). Dieselben Autoren postulierten ein beim Rottweiler familiär gehäuftes Auftreten aufgrund des gleichzeitigen Erkrankens zweier Wurfgeschwister.

Bei der Gegenüberstellung der beiden Vergleichspopulationen fiel eine Kongruenz hinsichtlich der Rasseverteilung auf (►Tab. 2). So stimmen die häufigsten 10 Rassen bis auf drei Rassen bei beiden Populationen überein. Wurde für die häufiger an einem Lymphom erkrankten Rassen das Quotenverhältnis in Relation zur Klinik- und Versicherungspopulation ermittelt, zeigte sich in Bezug auf die Klinikpopulation eine signifikante Häufung beim Bullmastiff, Briard, American Pitbull Terrier, American Staffordshire Terrier, Irish Setter und Rottweiler (s. auch Odds Ratios, ►Tab. 1). In Relation zur Versicherungspopulation lagen bis auf den Irish Setter dieselben Rassen an der Spitze, jedoch mit einer anderen Gewichtung. Übereinstimmend ergab sich also beim Vergleich mit beiden Referenzpopulationen eine Rasseprädisposition für American Pitbull Terrier, Briard, Bullmastiff und American Staffordshire Terrier. Beim Rottweiler wurde im Vergleich mit der Versicherungspopulation ein Quotenverhältnis > 3 (3,7) ermittelt, gegenüber der Klinikpopulation betrug dieses lediglich 2,8.

Das durchschnittliche Körpergewicht der Hunde mit Lymphom von $30,2 \pm 13,7$ kg entspricht den Angaben früherer Studien, nach denen überwiegend mittlere und größere Hunde an einem Lymphom erkranken (7, 16, 23, 26, 34, 36). Gleiches gilt für die Altersverteilung in der Studienpopulation (Mittelwert $7,9 \pm 3,2$ Jahre). So wird sowohl von einem vermehrten Auftreten des Lymphoms im mittleren (14, 16, 25, 33, 34) als auch erst im fortgeschrittenen Alter (7, 8) berichtet. Bemerkenswert ist beim direkten Vergleich der unterschiedlichen Gewichtsklassen das signifikant höhere durchschnittliche Alter der Hunde mit einem Körpergewicht unter 15 kg sowie das signifikant niedrigere Alter der

Hunde mit T-Zell-Lymphom im Vergleich zu jenen mit B-Zell-Lymphom. Hierzu passt, dass die Rassen Australian Shepherd und Rhodesian Ridgeback, die in dieser Studie häufiger eine Hyperkalzämie und damit Hinweise für ein T-Zell-Lymphom aufwiesen, ebenfalls ein deutlich niedrigeres Alter im Vergleich zur Gesamtpopulation hatten. Umgekehrt waren beim West Highland White Terrier als wichtigstem Vertreter der Gewichtskategorie < 15 kg im Durchschnitt ältere Hunde betroffen.

Entsprechend früheren Angaben (1, 7, 14, 25, 26, 33) ergab sich in unserer Studie bezogen auf alle Hunde mit Lymphom keine statistisch relevante Geschlechtsprädisposition (54% männlich, 46% weiblich). Allerdings zeigten sich bei getrennter Analyse der Lymphome der T- und B-Zell-Linien signifikante Unterschiede. So fand sich bei den Hunden mit T-Zell-Lymphom eine signifikante Prädisposition männlicher Hunde (70%), während bei den Hunden mit B-Zell-Lymphom das Geschlechterverhältnis nahezu ausgeglichen war (48% Rüden). Beim Menschen besteht für das Non-Hodgkin-Lymphom eine Prädisposition für das männliche Geschlecht (15, 28). Die Hunde unserer Studienpopulation waren überwiegend unkastriert (60% gesamt, 67% der männlichen und 52% der weiblichen Hunde). Der Anteil kastrierter Hunde mit Lymphom war nicht signifikant höher als der der Klinikpopulation (40% vs. 36% kastrierte Hunde). Dieses Ergebnis ist von Interesse in Hinblick auf die aktuelle Diskussion hinsichtlich einer möglicherweise erhöhten Prävalenz der Erkrankung bei kastrierten Hunden (31), auf die sich in unserer Studie keine Hinweise ergaben.

Das multizentrische Lymphom kann mit einer paraneoplastischen Hyperkalzämie einhergehen, was mit hoher Spezifität auf einen T-Zell-Phänotyp des Lymphoms hinweist (14, 21). Größere Studien zum Gesamtanteil der Lymphome mit einer paraneoplastischen Hyperkalzämie liegen bislang nicht vor. In Berichten mit geringeren Fallzahlen, vorwiegend aus den Vereinigten Staaten, England und Frankreich, wurde bei 10% (von $n = 53$; Garrett et al. [11]), 11% (von $n = 77$; Daters et al. [5]), 13% (von $n = 98$; Zemann et al. [40]), 30–40% (von $n = 55$; Keller et al. [17]), 35% (von $n = 46$; Fournel-Fleury et al. [10]) und 54% (von $n = 50$; Brodsky et al. [2]) der Hunde mit Lymphom eine Hyperkalzämie nachgewiesen. Die Hinweise anderer Autoren, dass Boxer eine Prädisposition für das T-Zell-Lymphom zeigen (19, 24, 25), bestätigte sich indirekt auch in unserer Studie, da die Hälfte der erkrankten Boxer (3/6) eine Hyperkalzämie aufwiesen. Die Rassehäufung der Hyperkalzämie (Australian Shepherd, Boxer und Rhodesian Ridgeback) bleibt aufgrund der geringen Fallzahl lediglich hinweisgebend und sollte in nachfolgenden Studien weiter verfolgt werden, zumal sich hieraus für die Behandlung eine prinzipiell schlechtere Prognose für Hunde dieser Rassen ergeben müsste.

Da in den weiter zurückliegenden Jahren des Untersuchungszeitraums eine standardmäßige Immunphänotypisierung in Deutschland noch nicht etabliert war, liegen lediglich für 131 Hunde Ergebnisse der Typisierung vor. Entsprechend früheren Angaben (76% B-Zell-Lymphom, 22% T-Zell-Lymphom, 2% 0-Zell-Lymphom [29]; 85% B-Zell-Lymphom, 15% T-Zell-Lymphom [37]; 64% B-Zell-Lymphom, 35% T-Zell-Lymphom, 1% 0-Zell-Lymphom [25]; 64%

Fazit für die Praxis

Das multizentrische Lymphom ist eine weit verbreitete Tumorerkrankung des Hundes, mit der der Praktiker regelmäßig konfrontiert wird. Sie sollte auch bei bislang nicht als gehäuft betroffen beschriebenen Rassen (Briard, West Highland White Terrier, Irish Setter) in Erwägung gezogen werden. Bereits bekannte Rasseprädispositionen (Bullmastiff, American Staffordshire Terrier, American Pitbull Terrier) konnten bestätigt werden. Für Berner Sennenhund und Golden Retriever ist das häufige Auftreten lediglich der allgemeinen Popularität dieser Rassen geschuldet. Bei kleineren Rassen (< 15 kg) tritt das Lymphom im Vergleich zu großen Rassen bei deutlich älteren Tieren auf. Die höhere Prävalenz einer lymphomassoziierten paraneoplastischen Hyperkalzämie beim Australian Shepherd, Boxer und Rhodesian Ridgeback legt eine Prädisposition dieser Rassen für das T-Zell-Lymphom nahe.

B-Zell-Lymphom, 35% T-Zell-Lymphom, 1% 0-Zell-Lymphom [24]) überwogen auch in unserer Studie die B-Zell-Lymphome (104 Hunde, 79,4%) über die T-Zell-Lymphome (27 Hunde, 20,6%).

Interessenkonflikt

Die Autoren bestätigen, dass bei Erstellung dieser Studie kein Interessenkonflikt bestand.

Literatur

- Bäckgren AW. Lymphatic leukosis in dogs – an epizootological clinical and haematological study. *Acta Vet Scand* 1965; 6 (Suppl. 1): 1–80.
- Brodsky EM, Maudlin GN, Lachowicz JL, Post GS. Asparaginase and MOPP treatment of dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 2009; 23 (3): 578–584.
- Chiu BC, Hou N. Epidemiology and etiology of non-hodgkin lymphoma. *Cancer Treat Res* 2015; 165: 1–25.
- Cohen D, Booth S, Sussman O. Canine Lymphoma. WHO Conference on comparative studies in leukemias. Philadelphia, Penna; Geneva, Switzerland 1961.
- Daters AT, Mauldin GE, Mauldin GN, Brodsky EM, Post GS. Evaluation of a multidrug chemotherapy protocol with mitoxantrone based maintenance (CHOP-MA) for the treatment of canine lymphoma. *Vet Comp Oncol* 2009; 8 (1): 11–22.
- Dobson JM, Blackwood LB, McInnes EF, Bostock DE, Nicholls P, Hoather TM, Tom BD. Prognostic variables in canine multicentric lymphoma. *J Small Anim Pract* 2001; 42 (8): 377–384.
- Dorn CR, Taylor DO, Hibbard HH. Epizootologic characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma. *Am J Vet Res* 1967; 28 (125): 993–1001.
- Edwards DS, Henley WE, Harding EF, Dobson JM, Wood JL. Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. *Vet Comp Oncol* 2003; 1 (4): 200–206.
- Egenvall A, Nodtvedt A, Penell J, Gunnarsson L, Bonnett BN. Insurance data for research in companion animals: benefits and limitations. *Acta Vet Scand* 2009; 51: 42.
- Fournel-Fleury C, Ponce F, Felman P, Blavier A, Bonnefont C, Chabanne L, Marchal T, Cadore JL, Goy-Thollot I, Ledieu D, Ghernati I, Magnol JP. Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Vet Pathol* 2002; 39 (1): 92–109.
- Garrett LD, Thamm DH, Chun R, Dudley R, Vail DM. Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 2002; 16 (6): 704–709.
- Glickman LT, Raghavan M, Knapp DW, Bonney PL, Dawson MH. Herbicide exposure and the risk of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in Scottish Terriers. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224 (8): 1290–1297.
- Glickman LT, Schofer FS, McKee JJ, Reif JS, Goldschmidt MH. Epidemiologic study of insecticide exposures, obesity, and risk of bladder cancer in household dogs. *J Toxicol Environ Health* 1989; 28 (4): 407–414.
- Greenlee PG, Filippa DA, Quimby FW, Patniak AK, Calvano SE, Matus RE, Kimmel M, Hurvitz AI, Liebermann PH. Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer* 1990; 66 (3): 480–490.
- Grulich AE, Vajdic CM. The epidemiology of non-Hodgkin lymphoma. *Pathology* 2005; 37 (6): 409–419.
- Jagielski D, Lechowski R, Hoffmann-Jagielska M, Winiarczyk S. A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998–2000). *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2002; 49 (8): 419–424.
- Keller ET, MacEwen EG, Rosenthal RC, Helfand SC, Fox LE. Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. *J Vet Intern Med* 1993; 7 (5): 289–295.
- Kessler M, Kandel B. Chemotherapie des malignen Lymphoms beim Hund: Ergebnisse und Erfahrungen mit dem „Hofheimer Protokoll“ bei 57 Patienten. *Kleintierprax* 2003; 48: 261–328.
- Lurie DM, Lucroy MD, Griffey SM, Simonson E, Madewell BR. T-cell-derived malignant lymphoma in the boxer breed. *Vet Comp Oncol* 2004; 2 (3): 171–175.
- Marconato L, Leo C, Girelli R, Salvi S, Abramo F, Bettini G, Comazzi S, Nardi P, Albanese F, Zini E. Association between waste management and cancer in companion animals. *J Vet Intern Med* 2009; 23 (3): 564–569.
- Messinger JS, Windham WR, Ward CR. Ionized hypercalcemia in dogs: a retrospective study of 109 cases (1998–2003). *J Vet Intern Med* 2009; 23 (3): 514–519.
- Modiano JF, Breen M, Burnett RC, Parker HG, Inusah S, Thomas R, Avery PR, Lindblad-Toh K, Ostrander EA, Cutter GC, Avery AC. Distinct B-Cell and T-Cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. *Cancer Res* 2005; 65 (13): 5654–5661.
- Onions DE. A prospective survey of familial canine lymphosarcoma. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72 (4): 909–912.
- Pastor M, Chalvet-Monfray K, Marchal T, Keck G, Magnol JP, Fournel-Fleury C, Ponce F. Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *J Vet Intern Med* 2009; 23 (2): 301–310.
- Ponce F, Marchal T, Magnol JP, Turinelli V, Ledieu D, Bonnefont C, Pastor M, Delignette ML, Fournel-Fleury C. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet Pathol* 2010; 47 (3): 414–433.
- Priester WA. Canine lymphoma: relative risk in the boxer breed. *J Natl Cancer Inst* 1967; 39 (5): 833–845.
- Priester WA, McKay FW. The occurrence of tumors in domestic animals. *J Natl Cancer Inst* 1980; Monograph 54 (166): 1–210.
- Roman E, Smith AG. Epidemiology of lymphomas. *Histopathology* 2011; 58 (1): 4–14.
- Ruslander DA, Gebhard DH, Tompkins MB, Grindem CB, Page RL. Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. *In Vivo* 1997; 11 (2): 169–172.
- Skrabek P, Turner D, Seftel M. Epidemiology of non-Hodgkin lymphoma. *Transfus Apher Sci* 2013; 49 (2): 133–138.
- Smith AN. The role of neutering in cancer development. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2014; 44 (5): 965–975.
- Summers JF, Diesel G, Asher L, McGreevy PD, Collins LM. Inherited defects in pedigree dogs. Part 2: Disorders that are not related to breed standards. *Vet J* 2010; 183 (1): 39–45.
- Teske E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Vet Q* 1994; 16 (4): 209–219.
- Teske E, de Vos JP, Egberink HF, Vos JH. Clustering in canine malignant lymphoma. *Vet Q* 1994; 16 (2): 134–136.
- Thomas R, Seiser EL, Motsinger-Reif A, Borst L, Valli VE, Kelley K, Suter SE, Argyle D, Burgess K, Bell J, Lindblad-Toh K, Modiano JF, Breen M. Refining tumor-associated aneuploidy through 'genomic recoding' of recurrent DNA copy number aberrations in 150 canine non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2011; 52 (7): 1321–35.
- Valli VE, Kass PH, San Myint M, Scott E. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet Pathol* 2013; 50 (5): 738–748.
- Valli VE, Vernau W, de Lorimier LP, Graham PS, Moore PF. Canine indolent nodular lymphoma. *Vet Pathol* 2006; 43 (3): 241–256.
- Van Pelt RW, Conner GH. Clinicopathologic survey of malignant lymphoma in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 1968; 152 (7): 976–984.
- von Euler H, Einarsson E, Olsson U, Lagerstedt AS, Eriksson S. Serum thymidine kinase activity in dogs with malignant lymphoma: a potent marker for prognosis and monitoring the disease. *J Vet Intern Med* 2004; 18 (5): 696–702.
- Zemann BI, Moore AS, Rand WM, Mason G, Ruslander DM, Frimberger AE, Wood CA, L'Heureux DA, Gliatto J, Cotter SM. A combination chemotherapy protocol (VELCAP-L) for dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* 1998; 12 (6): 465–470.

4 Diskussion

Beim malignen Lymphom stellt, aufgrund des systemischen Charakters der Erkrankung, die Chemotherapie die Therapie der Wahl dar. Zahlreiche Studien zum effektivsten Chemotherapieprotokoll wurden in den letzten Jahrzehnten durchgeführt. Die Ergebnisse mehrerer Studien legen nahe, dass Protokolle ohne verlängerte Erhaltungsphase (diskontinuierliche Protokolle) gleiche Ergebnisse im Hinblick auf die Remissionszeit (duration of first remission, DFR) und Überlebenszeit (survival time, ST) der Patienten ergeben, wie Protokolle mit langer Erhaltungsphase (kontinuierliche Protokolle) (Chun et al., 2000; Moore et al., 2001; Garrett et al., 2002; MacDonald et al., 2005; Simon et al., 2006, 2010; Hosoya et al., 2007; Rassnick et al., 2010; Sorenmo et al., 2010). Darüber hinaus weisen Piek et al. (1999) mit höheren Behandlungskosten und häufigen Tierarztbesuchen auf eine mögliche Gefährdung der Besitzercompliance bei unnötig verlängerten Behandlungszeiten hin. Auch wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Erhaltungsprotokoll möglicherweise die Ausbildung der MDR (multi-drug resistance) fördern und die Überlebenszeit herabsetzen könnte (Moore et al., 1995; 2001). Diese Studien und Erkenntnisse haben dazu geführt, dass heute bei der Behandlung caniner Lymphome vorwiegend diskontinuierliche Protokolle zum Einsatz kommen. Bei genauerer Betrachtung basieren die Resultate allerdings auf relativ kleinen Fallzahlen (n=24-130) und es wurden häufig unterschiedliche Protokolle oder diese mit historischen Kontrollen aus unterschiedlichen Publikationen und Institutionen miteinander verglichen (Tabelle 2). Aus diesem Grund erscheint es angebracht, die gängige Therapiepraxis anhand einer Untersuchung mit deutlich höheren Fallzahlen und ohne die Limitierungen eines Vergleichs mit historischen Kontrollen oder Literaturdaten anderer Institutionen zu verifizieren.

Neben der Frage nach dem effektivsten Chemotherapieprotokoll gibt es kaum publizierte epidemiologische Daten zum caninen multizentrischen Lymphom in Deutschland. Epidemiologische Studien aus anderen Ländern weisen auf Rasseprädispositionen hin, allerdings ohne Bezug auf eine Vergleichspopulation zu nehmen (Priester und McKay 1980; Jagielski et al., 2002; Modiano et al., 2005). Auch in

dieser Hinsicht müssen hier einerseits grundlegende Daten erarbeitet und andererseits publizierte Ergebnisse hinterfragt werden.

Diese kumulative Arbeit zeigt zum einen, dass diskontinuierliche Protokolle tatsächlich keinen negativen Einfluss auf die Remissions- und Überlebenszeiten der behandelten Hunde haben und daher bevorzugt eingesetzt werden sollten. Zum anderen kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit geschlossen werden, dass sowohl die Klinikpopulation einer großen Überweisungsklinik als auch die Population krankenversicherter Hunde als Referenzgröße für eine epidemiologische Untersuchung herangezogen werden können.

In der ersten Publikation wurden zwei gleiche CHOP-LAsp Protokolle mit und ohne Erhaltungsphase im Hinblick auf ihre DFR und ST an über 400 Patienten miteinander verglichen. Die Untersuchungen wurden in derselben Institution und von denselben Onkologen, d.h. unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Trotz des großen Patientenguts in unserer Studie konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der DFR und ST zwischen beiden Protokollen nachgewiesen werden, sodass nach unserer Untersuchung ebenfalls ein diskontinuierliches Protokoll favorisiert werden sollte (Chun et al., 2000; Garrett et al., 2002; Simon et al., 2006; Rassnick et al., 2010). Allerdings zeigte sich vor allem bei spezieller Betrachtung nur der Patienten, die das Induktionsprotokoll auch tatsächlich beendeten, ein Trend zu einer verbesserten ein-Jahres Überlebensrate bei Therapie mit dem Erhaltungsprotokoll (70,5 % vs. 59 %). Diese Beobachtung ist vermutlich auf eine engmaschigere Kontrolle durch Spezialisten und ein frühzeitiges Eingreifen bei Anzeichen eines Rezidivs zurückzuführen. Die Hypothese, ein Erhaltungsprotokoll könne möglicherweise die Ausbildung der MDR fördern, wurde in unserer Studie somit nicht bestätigt.

Trotz der oben aufgeführten Vorteile gegenüber vorangegangenen Studien zeigt, aufgrund des retrospektiven Charakters, unsere Studie mehrere Limitationen auf. So wurde eine T-/B-Immunphänotypisierung lediglich bei 129/408 Patienten durchgeführt, was darauf zurückzuführen ist, dass in den weiter zurückliegenden Jahren des Untersuchungszeitraums (1997-2011) eine standardmäßige Immunphänotypisierung in Deutschland noch nicht etabliert war. Auch wäre aus

heutiger Sicht eine Subtypisierung des Lymphoms mittels Durchflusszytometrie im Hinblick auf prognostische Faktoren interessant. Zusätzlich wird das Ergebnis einer klinischen Studie stets stark von externen Faktoren, wie Besitzercompliance und finanziellen Limitierungen beeinflusst.

Die Therapieantwort wurde wie bei Keller et al. (1993), MacEwen et al. (1987) und Dobson et al. (2001) in der vorliegenden Studie in komplette Remission (100%), partielle Remission ($\geq 50\%$) und keine Remission (0%) eingeteilt. Demgegenüber steht die Definition der Tumorrückbildung als komplette Remission (100%), partielle Remission ($\geq 50\%$), stabile Erkrankung (0-50%) oder progressive Erkrankung (Piek et al., 1999; Baskin et al., 2000). Erst im Jahre 2009 wurde ein Konsensus-Report der Veterinary Oncology Group publiziert, der eine standardisierte Vorgehensweise bei der Beurteilung der Remission hämatopoetischer Tumoren nach den RECIST Kriterien ermöglicht (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours) (Vail et al., 2010). Die Umsetzung dieser Kriterien (vor allem Messungen der Zielläsionen mit Schublehre, Messungen durch zwei unabhängige Gutachter, Vorgehensweise bei der Therapieantwort, sowie bei der Re-Evaluation nach Therapie) war für diese retrospektive Studie und der damit unabänderbaren Vorgehensweise der Kliniker und bestehenden klinischen Reporte jedoch nicht möglich.

Unter Berücksichtigung der oben aufgeführten Limitationen wurden die weiteren Untersuchungen im Hinblick auf die prognostischen Faktoren mit denen in der Literatur verglichen.

Das **Stadium** war, im Gegensatz zu vielen vorangegangenen Studien (Jeglum et al., 1987; Greenlee et al., 1990; Hahn et al., 1992; Keller et al., 1993; Zemmann et al., 1998; Kiupel et al., 1999), in einer ersten multifaktoriellen Analyse unserer Studie negativ mit der Überlebenszeit korreliert. Die sechs Hunde, die nach der WHO in Stadium I eingeteilt wurden hatten eine längere Überlebenszeit im Vergleich zu den Hunden in den Stadien II-V. Nach Zensur der Hunde im Stadium I war jedoch in einer erneuten multifaktoriellen Analyse das Stadium nicht länger signifikant mit der Überlebenszeit assoziiert. Somit bestätigt die vorliegende Studie frühere Aussagen nicht, dass Patienten in Stadium V kürzere Remissions- und/oder Überlebenszeiten hätten (Myers et al., 1997; Vail und

Young, 2007).

Das **Substadium b** wurde in den allermeisten Studien als negativ prognostischer Faktor im Hinblick auf Remissions- und/oder Überlebenszeiten beschrieben (Greenlee et al., 1990; Keller et al., 1993; Myers et al., 1997; Zemann et al., 1998; Garrett et al., 2002; Simon et al., 2008). Dabei ist zu beachten, dass nach den konventionellen Kriterien der WHO ein Substadium b als ausschließlich "gestörtes Allgemeinbefinden" definiert wird. Zemann et al. (1998) und Moore et al. (2001) sowie diese Studie teilen unter anderem Hunde mit Hyperkalzämie unter das Substadium b ein. Aufgrund dieser Uneinigkeit veröffentlichen Barber und Weishaar 2016 einen Überblick über mögliche praxisbezogene Einteilungen im Hinblick auf das Substadium als Basis für standardisierte Kriterien und die damit verbundene Prognose (Barber und Weishaar 2016). In der vorliegenden Studie war lediglich das Substadium b zur Zeit des Rezidivs mit signifikant kürzeren Überlebenszeiten assoziiert. Ebenso wie ein erhöhtes **Alter** sehen wir das Substadium b bei einem Rezidiv als keinen unabhängigen prognostischen Faktor an, da es möglicherweise lediglich den Entschluss des Besitzers zur Euthanasie aufgrund einer reduzierten Lebensqualität widerspiegelt.

Die vorliegende Studie unterstützt die Aussage, dass eine **Vorbehandlung mit Glukokortikoiden** zu verkürzten Überlebenszeiten führt (Price et al., 1991, Piek et al., 1999, Vail et al., 2001). Dabei wird eine induzierte Multi-Drug Resistance durch eine Überexpression eines Glykoproteins (P-gp) an der Zelloberfläche vermutet (Moore et al., 1995; Vail et al., 2001; Rassnick et al., 2002). Darüber hinaus muss insgesamt der Einsatz von Glukokortikoiden als Bestandteil einer Chemotherapie diskutiert werden, da dies in Studien keinen Effekt auf den Therapieerfolg oder das Überleben hat (Zandvliet et al., 2013; Childress et al., 2016).

Eine **Thrombozytopenie** (in den vorherigen Studien als < 200.000 Zellen/ μ l definiert) bei Diagnosestellung wurde von einigen Autoren als prognostisch günstiger Faktor im Hinblick auf die Überlebenszeiten angegeben (Garrett et al., 2002; Rebhuhn et al., 2010). Dieses steht im Gegensatz zu unserer Studie, bei der eine negative Korrelation bezüglich der Überlebenszeit vorliegt. Zemann et al. (1998) und Moore et al. (2001) sahen die Thrombozytopenie bei Diagnosestellung lediglich als negativ prognostischen Faktor im

Hinblick auf die DFR an.

Zusätzlich zu den oben angegebenen häufig untersuchten prognostischen Faktoren war in der multifaktoriellen Analyse die **Applikation von Lomustin zur Intensivierung** im Induktionsprotokoll negativ mit der Überlebenszeit korreliert. Die Hunde lebten im Durchschnitt 100 Tage kürzer. Moore et al. (1999), Saba et al. (2007) und Rassnick et al. (2014) beschreiben Lomustin als sehr wirksames und gut toleriertes Chemotherapeutikum, was häufig bei Rezidiven eingesetzt wird, da es keine Kreuzresistenz mit anderen Medikamenten aufweist. Die Intensivierung der Therapie wurde nur in Fällen einer instabilen oder inkompletten Remission durchgeführt, so dass der Einsatz von Lomustin den Rückschluss auf einen inhärent aggressiveren Lymphomsubtyp zulässt. In Studien von Ponce et al. (2004) und Valli (2013) wurden bereits aggressivere Lymphomsubtypen (z.B. Burkitt-Lymphom, high-grade plasmacytoides T-Zell Lymphom) beschrieben, die Auswirkungen auf Remissions- und Überlebenszeiten haben können. Aufgrund des retrospektiven Charakters dieser Studie waren allerdings keine weiteren Untersuchungen im Hinblick auf die Subtypen möglich.

Im Gegensatz zu vielen vorangegangenen Studien (Moore et al., 1994; Teske et al., 1994 a, b; Valerius et al., 1997; Chun et al., 2000; Dobson et al., 2001; Ponce et al., 2004) sahen wir in der vorliegenden Studie keine Unterschiede in der DFR und ST zwischen den zwei **Immunphänotypen**. Eine meist mit dem T-Zell Phänotyp assoziierte **Hyperkalzämie** (Greenlee et al., 1990; Teske et al., 1994b) konnte ebenfalls in unserer Studie im Gegensatz zu Greenlee et al. (1990) und Valerius et al. (1997) nicht als negativ prognostischer Faktor im Hinblick auf die DFR und ST detektiert werden. Diese Beobachtung ist interessant und widerspricht der gängigen Literatur; es muss aber auch in diesem Fall auf die bereits angegebenen Limitationen der Studie hingewiesen werden.

In der zweiten eigenen Untersuchung wurden 411 Hunde mit multizentrischem Lymphom epidemiologisch ausgewertet. Epidemiologische Studien zu dieser Erkrankung liegen in Deutschland nach Kenntnis der Autorin bisher nicht vor. Epidemiologische Daten dienen der Feststellung einer Erkrankungsinzidenz und weisen bei Nachweis von Rasseprädispositionen auf genetische Faktoren hin, was einerseits für die Grundlagenforschung über die genetische Basis von Tumorerkrankungen,

andererseits aber auch auf züchterische Maßnahmen bei einzelnen Hunderassen dienlich sein kann. Je nach Popularität und geographischen Vorlieben gestaltet sich die regionale Häufigkeitsverteilung der einzelnen Hunderassen sehr unterschiedlich. Daher ist eine Vergleichspopulation, die als realistische Bezugsgröße zur Ermittlung einer Rasseprädisposition für eine Erkrankung dient, unumgänglich. In den letzten Jahren wurden in anderen Ländern bereits einige epidemiologische Studien zum caninen Lymphom durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in diesen Studien entweder völlig ohne Vergleichspopulation (Priester und McKay 1980; Jagielski et al., 2002; Modiano et al., 2005) oder in Relation zur Gesamtklinikpopulation einer Institution gesetzt (Keller et al., 1993; Teske et al., 1994c; Zemmann et al., 1998). Da eine Klinikpopulation überwiegend aus kranken Hunden besteht, ist es jedoch problematisch, diese in ihrer Zusammensetzung als repräsentativ für die Gesamtpopulation der Hunde eines Landes anzusehen, da krankheitsanfälligere Rassen überproportional in einer Klinikpopulation vertreten sein könnten. Auch könnten fachliche Schwerpunktsetzungen einer Klinik die Hospitalpopulation beeinflussen. Um diese Einflussfaktoren zu vermeiden, wurde in Ländern mit hohem Anteil versicherter Hunde (England und Schweden) für epidemiologische Studien mehrfach die Population krankenversicherter Hunde als Vergleich herangezogen. Da bei einer Krankenversicherung überwiegend gesunde Tiere erfasst werden, scheint hier die Annahme gerechtfertigt, dass diese in ihrer Zusammensetzung eine bessere Annäherung an die tatsächliche Rassezusammensetzung der Hundepopulation darstellt, als die Krankenhauspopulation. (Egenvall et al., 2002; Edwards et al., 2003; Egenvall et al., 2007). In Ländern wie Deutschland, mit nur geringem Anteil versicherter Hunde muss allerdings auch diese Bezugsgröße kritisch betrachtet werden, da nicht auszuschließen ist, dass eine Versicherung eventuell nur von bestimmten Besitzergruppen oder bevorzugt für bestimmte Rassetypen abgeschlossen wird.

In der vorliegenden Studie wurden daher erstmals zwei Populationen, die Gesamtklinikpopulation und die Population krankenversicherter Hunde, als Bezugsgrößen verwendet, wovon sich die Autoren eine höhere Aussagekraft im Hinblick auf Rasseprädispositionen versprochen.

Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien (USA-Priester und McKay 1980;

Niederlande-Teske et al., 1994c; USA-Zemann et al., 1998; Polen-Jagielski et al., 2002; USA-Modiano et al., 2005), konnte in unseren Auswertungen beim Vergleich der Hunde mit Lymphomerkkrankung mit beiden Vergleichspopulationen weder für den Golden Retriever noch für den Rottweiler eine signifikante Häufung gesehen werden. Vielmehr ist das in Absolutzahlen vermehrte Auftreten auf die allgemeine Popularität und Verbreitung dieser Rassen zurückzuführen. Im Gegensatz dazu bestätigt unsere Untersuchung für den Bullmastiff frühere Studien in denen für diese Rasse bereits eine Prädisposition beschrieben wurde (USA-Dorn et al., 1967; GB-Onions 1984 GB-Edwards et al., 2003). Da wir gleichzeitig eine signifikante Prädisposition für den Bullterrier, American Pitbull Terrier und American Staffordshire Terrier feststellen konnten, lässt dies, aufgrund der genealogisch gemeinsamen Herkunft dieser Rassen von der englischen Bulldogge, auf eine abstammungsgenetisch alte Komponente schließen.

In der Gewichtsgruppe < 15 kg wurde in unserer Studie der West Highland White Terrier als gehäuft vertretene Rasse festgestellt. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie von Kessler und Kandel (2003), die im Gegensatz zu den Ergebnissen von Edwards et al. (2003) steht. In human- und tiermedizinischen Studien wurden Immunerkrankungen als Risikofaktoren für Non-Hodgkin Lymphome beschrieben (Keller et al. 1992; Grulich und Vajdic 2005; Roman und Smith 2011). Der West Highland White Terrier ist für seine Veranlagung für immunvermittelte Erkrankungen, wie z.B. Allergien und autoimmune Hämopathien, bekannt, was die höhere Prävalenz dieser Rasse in der Lymphompopulation erklären könnte. Aufgrund des retrospektiven Charakters unserer Studie lässt sich allerdings bei unseren Patienten eine mögliche Assoziation mit Erkrankungen des Immunsystems nicht mehr ermitteln.

Das durchschnittliche Gewicht von 30,2 kg und durchschnittliche Alter von 7,9 Jahren der Hunde mit Lymphomerkkrankung entspricht vorangegangenen Studien, in denen mittelschwere bis schwere Hunde im mittleren Alter als am häufigsten betroffen beschrieben wurden (Priester 1967; Onions 1984; Teske et al. 1994a, b; Jagielski et al., 2002; Valli et al., 2013). Wir konnten darüber hinaus ein signifikant höheres Durchschnittsalter (9,3 Jahre) in der Gewichtsklasse <15 kg sowie ein signifikant geringeres Alter der Hunde mit T-Zell Lymphom im Vergleich zum B-Zell Lymphom feststellen (6,4 Jahre vs. 8,5 Jahre). Auch hier könnten genetische Komponenten eine

Rolle spielen, die altersabhängig zu unterschiedlichen Lymphomsubtypen führen (Fallah et al., 2014).

Rassehäufungen im Hinblick auf eine Hyperkalzämie, welche mit hoher Spezifität auf einen T-Zell Phänotyp des Lymphoms hinweist (Greenlee et al., 1990; Messinger et al., 2009), waren in unserer Studie bei Boxern, Australian Shepherds und Rhodesian Ridgebacks zu sehen. Allerdings sollte dieses, aufgrund der geringen Fallzahlen, mit weiteren Studien bestätigt werden.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Rasseprädispositionen beim caninen malignen Lymphom regional, bzw. länderspezifisch angesehen werden müssen und nur teilweise Gemeinsamkeiten mit den USA oder anderen europäischen Ländern aufweisen. Darüber hinaus konnte in unserer Studie gezeigt werden, dass sowohl die Klinikpopulation einer großen (Überweisungs-)Klinik als auch die Population krankenversicherter Hunde aus dem jeweiligen Land zu vergleichbaren Ergebnissen führt und daher beide als Bezugsgröße eingesetzt werden können.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden zwei unterschiedliche Aspekte zum caninen multizentrischen malignen Lymphom genauer untersucht. In der ersten Studie wurden zwei identische Polychemotherapieprotokolle mit und ohne Erhaltungsphase miteinander verglichen. Solch eine Untersuchung wurde, nach Kenntnis der Autorin, erstmalig in der gleichen Institution, mit gleichen Protokollen, unter gleichen Bedingungen und von den gleichen Klinikern an einem so großen Patientengut (> 400 Patienten) durchgeführt. In der zweiten Studie wurden erstmals die epidemiologischen Daten zu dieser Erkrankung in Deutschland ermittelt und mit zwei unterschiedlichen Bezugsgrößen, der Klinik- und der Versicherungspopulation in Deutschland, verglichen, um eine Rasseprädisposition genau bestimmen zu können.

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Polychemotherapieprotokolle zur Behandlung des caninen malignen Lymphoms publiziert. In diesem Zusammenhang wurden auch Protokolle mit und ohne Erhaltungsphase miteinander verglichen, wobei die meisten Studien keinen Unterschied zwischen den Protokollen sahen, so dass heute allgemein Kurzprotokolle favorisiert werden. Allerdings basieren die meisten Studien auf relativ kleinen Fallzahlen, und es wurden häufig unterschiedliche Protokolle oder historische Kontrollen verglichen, was die Aussagekraft dieser Studien einschränkt und einen eindeutigen Vergleich schwierig macht.

Ziel der ersten retrospektiven Studie (1997-2011) war die Untersuchung von zwei gleichen CHOP-LAsp Protokollen mit und ohne Erhaltungsphase im Hinblick auf die jeweiligen Remissions (DFR)- und Überlebenszeiten (ST) an einem weit größeren Patientengut als bisher publiziert. Alle Patienten wurden in derselben Institution und von denselben Onkologen behandelt, um interinstitutionelle Einflussfaktoren auszuschließen. Darüber hinaus wurde der Einfluss weiterer prognostischer Faktoren untersucht, v.a. Alter, Geschlecht, Rasse, Gewicht, T-/B-Immunphänotyp, Stadium, Substadium bei Diagnosestellung und nach Rezidiv, Thrombozytopenie bei Diagnosestellung, Vorbehandlung mit Glukokortikoiden und Intensivierung der Therapie nach partieller oder instabiler Remission.

Vierhundertundacht Hunde mit bestätigtem multizentrischen high-grade Lymphom wurden mit einem 28-Wochen dauernden CHOP-LAsp Induktionsprotokoll behandelt. Bei 75/408 Hunden wurde eine Erhaltungsphase mit einer Gesamtdauer von zwei Jahren angeschlossen. Bei 333/408 Hunden wurde die Therapie nach 28 Wochen beendet. Die medianen Remissions- und Überlebenszeiten waren 216 und 375 Tage versus 184 und 304 Tage. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Protokollen ($P=0,291$ für ST; $P=0,071$ für DFR). Die Studie unterstützt daher die Verwendung von Kurzprotokollen ohne längere Erhaltungsphasen. Bei der mehrfaktoriellen Analyse waren Stadium, Substadium b nach Rezidiv, fortgeschrittenes Alter, Thrombozytopenie bei Diagnosestellung, sowie Vorbehandlung mit Glukokortikoiden und Intensivierung der Therapie nach partieller oder instabiler Remission in beiden Gruppen negativ mit der Überlebenszeit korreliert.

Ziel der zweiten retrospektiven Studie (1997-2011) war die epidemiologische Auswertung von 411 Hunden mit multizentrischem high-grade Lymphom in Deutschland. Untersucht wurden Rasse, Alter, Geschlecht, Gewicht und der Anteil der Hunde mit Hyperkalzämie bzw. T- und B-Zell Lymphom. Als Bezugsgröße dienten erstmals in Deutschland zwei Vergleichspopulationen: die Klinikpopulation der Tierklinik Hofheim (52.142 Hunde) sowie eine Population krankenversicherter Hunde in Deutschland (123.423 Hunde).

Rasseprädispositionen für den American Pitbull Terrier, American Staffordshire Terrier, Briard und Bullmastiff konnten beim Vergleich mit beiden Bezugsgrößen übereinstimmend bestätigt werden. In vorangegangenen Studien als prädisponiert beschriebene Rassen wie der Golden Retriever (Odds Ratio 1,3/0,9), Rottweiler (Odds Ratio 2,8 /3,6) und Berner Sennenhund (Odds Ratio 2,4/2,0) waren beim Vergleich mit den Bezugsgrößen lediglich in absoluten Zahlen gehäuft vertreten und somit ihrer allgemeinen Popularität geschuldet. Bei den kleinen Hunderassen (< 15 kg) konnte eine Rassehäufung für den West Highland White Terrier (Odds Ratio 1,1 bzw. 2,5 (Vergleich zur Klinik- bzw. Versicherungspopulation)) gesehen werden, wobei er mit einem signifikant höheren Erstvorstellungsalter vorgestellt wurde (durchschnittlich 11,4 Jahre im Gegensatz zu 7,9 Jahren bei den übrigen Rassen). Eine paraneoplastische Hyperkalzämie als Zeichen eines T-Zell Lymphoms lag bei 11,4 % der Hunde vor, wobei

Australian Shepherds, Boxer und Rhodesian Ridgebacks häufiger betroffen waren. Insgesamt wiesen 20,6 % der Patienten einen T-Zell Immunphänotyp auf.

Es konnte gezeigt werden, dass bei epidemiologischen Studien als Bezugsgröße sowohl die Klinikpopulation einer großen (Überweisungs-)Klinik, als auch die Population krankenversicherter Hunde aus dem jeweiligen Land zu vergleichbaren Ergebnissen führt.

6 Extended Summary

In the present study, evaluation of two different aspects of the canine multicentric malignant lymphoma was performed. As far as known by the author, it was the first time to compare two identically polychemotherapy protocols with and without maintenance phase, performed in the same institution, by the same clinicians, under the same conditions on such a large study population (>400 patients). In the second study, epidemiological aspects of the disease in Germany were analyzed for the first time as well. To detect potential breed predisposition, epidemiological data were compared with two different reference population, the total hospital population of the Small Animal Clinic Hofheim and the population of dogs with health insurance in Germany, respectively.

In the past decades, numerous polychemotherapy protocols for the treatment of canine malignant lymphoma have been published. Lymphoma chemotherapy protocols can generally be divided into those consisting of an induction period followed by a prolonged “maintenance phase” (continuous protocols) and discontinuous protocols which leave the dog without maintenance therapy after induction. Research into veterinary lymphoma protocols has been mainly focusing on the efficacy of the respective protocol. Several studies compared continuous and discontinuous protocols and concluded that both were equally effective. Based on these studies, discontinuous protocols are currently recommended and widely used. However, this observation is based on studies with relatively small case numbers, and frequently completely different protocols or published historic data were used for comparison, which limits the level of evidence and makes the comparison rather challenging.

The goal of our first study (1997-2011) was to retrospectively compare the duration of first remission (DFR) and overall survival time (ST) with a polychemotherapy protocol with and without a maintenance phase in a large study population, treated in the same institution and by the same clinicians, thus eliminating interinstitutional variances and the disadvantage of using historic controls. In addition, other prognostic factors such as age, gender, breed, bodyweight, T/B-immunophenotype, stage, substage at the time of

diagnosis and at relapse, thrombocytopenia at diagnosis, corticosteroid pretreatment and incomplete or unstable remission necessitating intensification of therapy were evaluated, to assess their efficacy and significance.

Four hundred and eight dogs with multicentric high-grade lymphoma were treated with a CHOP-LAsp based induction protocol of 28 weeks duration. In 75 of these 408 dogs, this protocol was followed by a maintenance protocol with a total treatment duration of two years. In the subsequent 333/408 dogs, therapy was discontinued after induction. The median DFR and ST in the two groups were 216 and 375 versus 184 and 304 days, respectively. There was no statistical difference between both treatment groups. This study supports the use of a discontinuous protocol for canine multicentric lymphoma.

On multivariate analysis, stage, substage b at relapse, advanced age, thrombocytopenia at diagnosis, corticosteroid pretreatment, and incomplete or unstable remission necessitating intensification of therapy were negatively correlated with ST in both groups.

In the second study (1997-2011), 411 dogs with multicentric high-grade lymphoma were retrospectively analyzed by regarding epidemiologic aspects of this disease in Germany. Breed, age, sex, weight and the proportion of patients with hypercalcemia respectively T- and B-immunophenotype were determined. For the sake of better comparison, two reference population were used: the total hospital population of the Small Animal Clinic Hofheim (52,142 dogs) and the population of dogs with health insurance in Germany (123,423 dogs).

In comparison with both reference population, a breed predisposition for American Pitbull Terrier, American Staffordshire Terrier, Briard, and Bullmastiff was demonstrated. Golden Retriever (Odds Ratio 1,3/0,9), Rottweiler (Odds Ratio 2,8 /3,6) and Bernese Mountain dogs (Odds Ratio 2,4/2,0) were frequently affected in absolute numbers, but when compared to the reference populations, this was merely due to the overall popularity of these breeds. Among the small dogs (< 15 kg), the West Highland White Terriers were frequently affected (Odds Ratio 1,1 and 2,5 (Comparison between the hospital and the population of dogs with health insurance)). They were presented at a significant older mean age (11.4 years) compared to the mean age (7.9 years) of the whole patient population. Hypercalcemia as an indicator of T-cell lymphoma was

present in 11.4 % of the dogs, with Australian Shepherds, Boxer and Rhodesian Ridgebacks overproportionally affected. Overall, 20.6 % of the patients had a T-cell immunophenotype.

The study demonstrated that for the assessment of breed predispositions for certain diseases both the total hospital population of a (referral) hospital as well as the population of dogs with health insurance will yield similar results.

7 Literaturverzeichnis

1. ABADIE, J., HEDAN, B., CADIEU, E., DE BRITO, C., DEVAUCHELLE, P., BOURGAIN, C., PARKER, H. G., VAYSSE, A., MARGARITTE-JEANNIN, P., GALIBERT, F., OSTRANDER, E. A., ANDRÉ, C. (2009) Epidemiology, pathology, and genetics of histiocytic sarcoma in the Bernese mountain dog breed. *Journal of Heredity* 100, 19-27
2. AGUIRRE, G. D. (2000) DNA testing for inherited canine diseases. In: Bonagura J (Hrsg.) *Current Veterinary Therapy XIII*. Philadelphia: WB Saunders Co. 909-913
3. ALVAREZ, F. J., KISSEBERTH, W. C., GALLANT, S. L., COUTO, C. G. (2006) Dexamethasone, Melphalan, Actinomycin D, Cytosine Arabinoside (DMAC) Protocol for dogs with relapsed lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20, 1178-1183
4. APPELBAUM, F. R., DEEG, H. J., STORB, R., GRAHAM, T. C., CHARRIER, K., BENSINGER, W. (1986) Cure of malignant lymphoma in dogs with peripheral blood stem cell transplantation. *Transplantation* 42, 19-22
5. de ARESPACOCCHAGA, A. G., SCHWENDENWEIN, I., WEISSENBOCK, H. (2007) Retrospective Study of 82 Cases of Canine Lymphoma in Austria based on the Working Formulation and immunphenotyping. *Journal of the Comparative Pathology* 136, 186-192
6. ARESU, L., ARICO, A., FERRARESSO, S., MARTINI, V., COMAZZI, S., RIONDATO, F., GIANTIN, M., DACASTO, M., GUADAGNIN, E., FRAYSSINET, P., ROUQUET, N., DRIGO, M., MARCONATO, L. (2014) Minimal residual disease detection by flow cytometry and PARR in lymph node, peripheral blood and bone marrow, following treatment of dogs with diffuse large B-cell lymphoma. *The Veterinary Journal* 200, 318-324
7. BÄCKGREN, A. W. (1965) Lymphatic leukosis in dogs - an epizootological clinical and haematological study. *Acta Veterinaria Scandinavia* 6, 1-80
8. BARBER, L. G., WEISHAAR, K. M. (2016) Criteria for designation of clinical substage in canine lymphoma: a survey of veterinary oncologist. *Veterinary and Comparative Oncology* 14, 32-39
9. BASKIN, C. R., COUTO, C. G., WITTUM, T. E. (2000) Factors influencing first remission and survival in 145 dogs with lymphoma: a retrospective study. *Journal of the*

American Animal Hospital Association 36, 404-409

10. BAUER, N. B., ZERVOS, D., MORITZ, A. (2007) Argyrophilic nucleolar organizing regions and Ki67 equally reflect proliferation in fine needle aspirates of normal, hyperplastic, inflamed and neoplastic canine lymph nodes (n=101). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21, 928-935
11. BEAVER, L. M., STROTTNER, G., KLEIN, M. K. (2010) Response rate after administration of a single dose of doxorubicin in dogs with B-cell or T-cell lymphoma: 41 cases (2006-2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 237, 1052-1055
12. BEHERA, M., KUMAR, A., SOARES, H. P., SOKOL, L., DJULBEGOVIC, B. (2007) Evidence-based medicine for rare diseases: implications for data interpretation and clinical trial design. *Cancer Control* 14, 160-166
13. BELL, R., SCOTTER, S., LILLQUIST, A., SALLAN, S., McCAFFREY, R. (1984) Characterization of glucocorticoid receptors in animal lymphoblastic disease: correlation with response to single-agent glucocorticoid treatment. *Blood Journal* 63, 380-383
14. BELLUCO, S., BRISEBARD, E., WATRELOT, D., PILLET, E., MARCHAL, T., PONCE, F. (2013) Digital squamous cell carcinoma in dogs: epidemiological, histological, and immunohistochemical study. *Veterinary Pathology* 50, 1078-1082
15. BERGMAN, P. J. (2003) Mechanisms of anticancer drug resistance. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 33, 651-667
16. BERGMAN, P. J. (2012) Paraneoplastic hypercalcemia. *Topics in Companion Animal Medicine* 27, 156-158
17. BILLROTH, T. (1871) Multiple Lymphome. Erfolgreiche Behandlung mit Arsen. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 21, 1006-1067
18. BOYCE, K. L., KITCHELL, B. E. (2000) Treatment of canine lymphoma with COPLA/LVP. *Journal of the American Animal Hospital Association* 36, 395-403
19. BRODSKY, E. M., MAUDLIN, G. N., LACHOWICZ, J. L., POST, G. S. (2009) Asparaginase and MOPP treatment of dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 578-584
20. BROWN, D. E., THRALL, M. A., GETZY, D. M., WEISER, M. G., OGILVIE, G. K. (1994) Cytology of canine malignant histiocytosis. *Veterinary Clinical Pathology* 23, 118-123

21. BURTON, J. H., GARRETT-MAYER, E., THAMM, D. H. (2013) Evaluation of a 15-week CHOP protocol for the treatment of canine multicentric lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 11, 306-315
22. CARTER, R. F., VALLI, V. E. O., LUMSDEN, J. H. (1986) The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formulation. *Canadian Journal of Veterinary Research* 50, 154-164
23. CARTER, R. F., HARRIS, C. K., WITHROW, S. J., VALLI, V. E. O., SUSANECK, S. J. (1987) Chemotherapy of canine lymphoma with histopathological correlation: doxorubicin alone compared to COP as first treatment regimen. *Journal of the American Animal Hospital Association* 23, 587-596
24. CHIKIZAWA, S., HORI, Y., HOSHI, F., KANAI, K., ITO, N. (2015) Hyperferritinemia is associated with short survival time in dogs with multicentric lymphoma. *The Journal of Veterinary Medical Science* 77, 843-846
25. CHILDRESS, M. O., RAMOS-VARA, J. A., RUPLE, A. (2016) A randomized controlled trial of the effect of prednisone omission from a multidrug chemotherapy protocol on treatment outcome in dogs with peripheral nodal lymphomas. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 249, 1067-1078
26. CHUN, R., GARRETT, L. D., VAIL, D. M. (2000) Evaluation of a high-dose chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14, 120-124
27. COHEN, D., BOOTH, S., SUSSMAN, O. (1961) Canine lymphoma. WHO conference on comparative studies in leukemias, Philadelphia, Penna; Geneva, Switzerland
28. COMAZZI, S., GELAIN, M. E. (2011) Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *The Veterinary Journal* 188, 149-155
29. COTTER, S. M. (1983) Treatment of lymphoma and leukemia with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone: II treatment of cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* 19, 166-172
30. COTTER, S. M., GOLDSTEIN, M. A. (1986) Comparison of two protocols for maintenance of remission in dogs with lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association* 23, 495-499

31. COUTO, C. G. (1985) Canine lymphomas: something old, something new. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian* 7, 291-302
32. COUTO, C. G., RUTGERS, H. C., SHERDING, R. G., ROJKO, J. (1989) Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs. A retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 3, 73-78
33. COYLE, K. A., STEINBERG, H. (2004) Characterization of lymphocytes in canine gastrointestinal lymphoma. *Veterinary Pathology* 41, 141-146
34. CULMSEE, K., Simon, D., MISCHKE, R., NOLTE, I. (2001) Possibilities of flow cytometric analysis for immunphenotypic characterization of canine lymphoma. *Journal of Veterinary Medicine. A Physiology, Pathology Clinical Medicine Journal* 48, 199-206
35. DATERS, A. T., MAULDIN, G. E., MAULDIN, G. N., BRODSKY, E. M., POST, G. S. (2010) Evaluation of a multidrug chemotherapy protocol with mitoxantrone based maintenance (CHOP-MA) for the treatment of canine lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 8, 11-22
36. DAVIS, B. W., OSTRANDER, E. A. (2014) Domestic dogs and cancer research: a breed-based genomics approach. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 55, 59-68
37. DEEG, H. J., APPELBAUM, F. R., WEIDEN, P. L., HACKMAN, R. C., GRAHAM, T. C., STORB, R. C. (1985) Autologous marrow transplantation as consolidation therapy of canine lymphoma: efficacy and toxicity of various regimens of total body irradiation. *American Journal of Veterinary Research* 46, 2016-2018
38. DOBSON, J. M., BLACKWOOD, L. B., McINNES, E. F., BOSTOCK, D. E., NICHOLLS, P., HOATHER, T. M., TOM, B. D. M. (2001) Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *Journal of Small Animal Practice* 42, 377-384
39. DOBSON, J. M., SAMUEL, S., MILSTEIN, H., ROGERS, K., WOOD, J. L. (2002) Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice* 43, 240-246
40. DOBSON, J. (2004) Classification of canine lymphoma: a step forward. *The Veterinary Journal* 2, 125-126
41. DORN, C. R., TAYLOR, D. O., HIBBARD, H. H. (1967) Epizootiologic characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma. *American Journal of Veterinary Research*

42. DORN, C. R., TAYLOR, D. O., SCHNEIDER, R., HIBBARD, H. H., KLAUBER, M. R. (1968) Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute* 40, 307-318
43. EDWARDS, D. S., HENLEY, W. E., HARDING, E. F., DOBSON, J. M., WOOD, J. L. (2003) Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. *Veterinary and Comparative Oncology* 1, 200-206
44. EGENVALL, A., NODTVEDT, A., PENELL, J., GUNNARSSON, L., BONNETT, B. N. (2009) Insurance data for research in companion animals: benefits and limitations. *Acta Veterinaria Scandinavica* 51, 42
45. ERNST, T., KESSLER, M., LAUTSCHAM, E. M., WILLIMZIG, L., NEIGER, R. (2016) Das multizentrische maligne Lymphom beim Hund – eine epidemiologische Studie mit 411 Patienten. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Kleintiere Heimtiere* 17, 245-251
46. EUROPEAN COLLEGE OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE OF COMPANIAN ANIMALS (2007) Preventing occupational and environmental exposure to cytotoxic drugs in veterinary medicine. ECVIM Guidelines www.ecvim-ca.org
47. FALLAH, M., LIU, X., JI, J., FÖRSTI, A., SUNDQUIST, K., HEMMINKI, K. (2014) Hodgkin lymphoma after autoimmune diseases by age at diagnosis and histological subtype. *Annals of Oncology* 25, 1397-1404
48. FAN, T. M., KITCHELL, B. E. (2002) An update on diagnosing and treating canine lymphosarcoma. *Veterinary Medicine* 97, 58-67
49. FLORY, A. B., RASSNICK, K. M., AL-SARRAF, R., BAILEY, D. B., BALKMAN, C. E., KISELOW, M. A., AUTIO, K. (2008) Combination of CCNU and DTIC chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22, 164-171
50. FOURNEL-FLEURY, C., MAGNOL, J. P., CHABANNE, L., GHERNATI, I., MARCHAL, T., BONNEFOND, C., BRYON, P. A., FELMAN, P. (1997) Growth fractions in canine non-Hodgkins Lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki-67 antigen. *Journal of Comparative Pathology* 1, 61-72
51. FOURNEL-FLEURY, C., PONCE, F., FELMAN, P., BLAVIER, A., BONNEFONT, C., CHABANNE, L., MARCHAL, T., CADORE, J. L., GOY-THOLLOT, I., LEDIEU, D.,

- GHERNATI, I., MAGNOL, J. P. (2002) Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Veterinary Pathology* 39, 92-109
52. GARRETT, L. D., THAMM, D. H., CHUN, R., DUDLEY, R., VAIL, D. M. (2002) Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16, 704-709
53. GLICKMAN, L. T., SCHOFER, F. S., MCKEE, I. J., REIF, J. S., GOLDSCHMIDT, M. H. (1989) Epidemiologic study of insecticide exposures, obesity, and risk of bladder cancer in household dogs. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 28, 407-414
54. GLICKMAN, L. T., RAGHAVAN, M., KNAPP, D. W., BONNEY, P. L., DAWSON, M. H. (2004) Herbicide exposure and the risk of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in Scottish Terriers. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 224, 1290-1297
55. GREENLEE, P. G., FILIPPA, D. A., QUIMBY, F. W., PATNAIK, A. K., CALVANO, S. E., MATUS, R. E., KIMMEL, M., HURVITZ, A. I., LIEBERMANN, P. H. (1990) Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer* 66, 480-490
56. GRULICH, A. E., VAJDIC, C. M. (2005) The epidemiology of non-hodgkin lymphoma. *Pathology* 37, 409-419
57. HAHN, K. A., RICHARDSON, A. C. TECLAW, R. F., CLINE, J. M., CARLTON, W. W., DeNICOLA, D. B., BONNEY, P. L. (1992) Is maintenance chemotherapy appropriate for the management of canine malignant lymphoma? *Journal of Veterinary Internal Medicine* 6, 3-10
58. HAHN, K. A., BARNHILL, M. A., FREEMAN, K. P., SHOIEB, A. M. (1999) Detection and clinical significance of plasma glutathione-S-transferases in dogs with lymphoma. *In Vivo* 13, 173-175
59. HIGGINBOTHAM, M. L., McCAW, D. L., ROUSH, J. K., NIETFELD, J. C., WILKERSON, M. J., REEDS, K., BURR, D. (2013) Intermittent single-agent doxorubicin for the treatment of canine B-cell lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association* 49, 357-362
60. HIRSCHBERGER, J. (2001) Prinzipien der Chemotherapie beim Hund. *Tierärztliche Praxis* 29, 20-24
61. HIRSCHBERGER, J. (2013) Medikamente, Dosierungen, Behandlungsprotokolle. In: *Kleintieronkologie*, Hrsg, Kessler, M. Enke Verlag Stuttgart 9.2, 100-114

62. HODGKIN, T. (1832) On some morbid apperances of the absorbend glands and spleen. Royal Medical and Chirurgical Society of London 17, 68-114
63. HOSOYA, K., KISSEBERTH, W. C., LORD, L. K., ALVAREZ, F. J., LARA-GARCIA, A., KOSAREK, C. E., LONDON, C. A., COUTO, C. G. (2007) Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma. Journal of Veterinary Internal Medicine 21, 1355-1363
64. JAGIELSKI, D., LECHOWSKI, R., HOFFMANN-JAGIELSKI, M., WINIARCZYK, S. (2002) A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998-2000). Journal of Veterinary Internal Medicine Series A 49, 419-424
65. JEFFREYS, A. B., KNAPP, D. W., CARLTON, W. W., THOMAS, R. M., BONNEY, P. L., DeGORTARI, A., LUCROY, M. D. (2005) Influence of asparaginase on a combination chemotherapy protocol for canine multicentric lymphoma. Journal of the American Animal Hospital Association 41, 221-226
66. JEGLUM, K. A., YOUNG, K. M., BARNSLEY, K., WHEREAT, A. (1988) Chemotherapy versus chemotherapy with intralymphatic tumor cell vaccine in canine lymphoma. Cancer 61, 2042-2050
67. JOETZKE, A. E., EBERLE, N., NOLTE, I., MISCHKE, R., SIMON, D. (2012) Flow cytometric evaluation of peripheral blood and bone marrow and fine-needle aspirate samples from multiple sides in dogs with multicentric lymphoma. American Journal of Veterinary Research 73, 884-893
68. JOHNSON, R. E., O'CONNOR, G. T., TITUS, W., HAFERMANN, M. D. (1969) Comparative clinical, histologic, and radiotherapeutic aspects of canine and human malignant lymphoma. Radiology 93, 395-399
69. KARTNER, N., RIORDAN, J. R., LING, V. (1983) Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. Science 221, 1285-1288
70. KELLER, E. T. (1992) Immune-mediated disease as a risk factor for canine lymphoma. Cancer 70, 2334-2337
71. KELLER, E. T., MacEWEN, E. G., ROSENTHAL, R. C., HELFAND, S. C., FOX, L. E. (1993) Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. Journal of Veterinary Internal Medicine 7, 289-295

72. KESSLER, M., VON BOMHARD, D. (1997) Plattenepithelkarzinome bei Hunden und Katzen - Prävalenz, Rasseprädisposition und Primärlokalisationen. Proc. 22. DVG Kongress, Bad Nauheim.
73. KESSLER, M., KANDEL, B. (2004) Chemotherapie des malignen Lymphoms beim Hund: Ergebnisse und Erfahrungen mit dem „Hofheimer Protokoll“ bei 57 Patienten. Kleintierpraxis 49, 349-358
74. KIUPEL, M., TESKE, E., BOSTOCK, D. (1999) Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. Veterinary Pathology 36, 292-300
75. KRÓL, M., PAWLOWSKI, K. M., MAJCHRZAK, K., SZYSZKO, K., MOTYL, T. (2010) Why chemotherapy can fail?. Polish Journal of Veterinary Science 13, 399-406
76. KUBOTA, A., KANO, R., MIZUNO, T., HISASUE, M., MOORE, P. F., WATARI, T., TSUJIMOTO, H., HASEGAWA, A. (2002) Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) produced by dog lymphoma cells. Journal of Veterinary Medical Science 64, 835-837
77. LANDGREN, O., PORWIT Mac DONALD, A., TANI, E., CZADER, M., GRIMFORS, G., SKOOG, L., ÖST, A., WEDELIN, C., AXDORPH, U., SVEDMYR, E., BJÖRKHOLM, M. (2004) A prospective comparison of fine-needle aspiration cytology and histopathology in the diagnosis and classification of lymphomas. The Hematology Journal 5, 69-76
78. LENNERT, K. MOHRI, N., STEIN, H., KAISERLING, E. (1975) The histopathology of malignant lymphoma British Journal of Haematology, Suppl. 31, 193-203
79. LEQUARRÉ, A. S., ANDERSSON, L., ANDRÉ, C., FREDHOLM, M., HITTE, C., LEEB, T., LOHI, H., LINDBLAD-TOH, K., GEORGES, M. (2011) LUPA: a European initiative taking advantage of the canine genome architecture for unravelling complex disorders in both human and dogs. The Veterinary Journal 189, 155-159
80. LINGAAS, F., COMSTOCK, K. E., KIRKNESS, E. F., SOERENSEN, A., AARSKAUG, T., HITTE, C., NICKERSON, M. L., MOE, L., SCHMIDT, L. S., THOMAS, R., BREEN, M., GALIBERT, F., ZBAR, B., OSTRANDER, E. A. (2003) A mutation in the canine BHD gene is associated with hereditary multifocal renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis in the German Shepherd dog. Human Molecular Genetics 12, 3043-3053
81. LINK, M. (1997) Maligne Lymphome und lymphatische Leukämien in der Veterinärmedizin und der Humanmedizin: Eine vergleichende Studie. München,

82. LONGO, D. L., YOUNG, R. C., WESLEY, M., HUBBARD, S. M., DUFFEY, P. L., JAFFE, E. S., De VITA, V. T. Jr. (1986) Twenty years of MOPP therapy for hodgkin's disease. *Journal of Clinical Oncology* 4, 1295-1306
83. LORI, J. C., STEIN, T. J., THAMM, D. H. (2010) Doxorubicin and cyclophosphamide for the treatment of canine lymphoma: a randomized, placebo-controlled study *Veterinary and Comparative Oncology* 8, 188-195
84. LURIE, D. M., LUCROY, M. D., GRIFFEY, S. M., SIMONSON, E., MADEWELL, B. R. (2004) T-cell-derived malignant lymphoma in the boxer breed. *Veterinary and Comparative Oncology* 2, 171-175
85. LURIE, D. M., GORDON, I. K., THÉON, A. P., RODRIGUEZ, C. A., SUTER, S. E., KENT, M. S. (2009) Sequential-low dose rate half-body irradiation and chemotherapy for the treatment of canine multicentric lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 3, 1064-1070
86. MacDONALD, V. S., THAMM, D. H., KURZMAN, I. D., TUREK, M. M., VAIL, D. M. (2005) Does L-asparaginase influence efficacy or toxicity when added to a standard CHOP protocol for dogs with lymphoma? *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19, 732-736
87. MacEWEN, E. G., HAYES, A. A., MATUS, R. E., KURZMAN, I. (1987) Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog: 147 cases (1978-1981). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 5, 564-568
88. MacVEAN, D. W., MONLUX, A. W., ANDERSON, P. S., SILBERG, S. L., ROSZEL, J. F. (1978) Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Veterinary Pathology* 15, 700-715
89. MADEWELL, B. R. (1986) Hematological and bone marrow cytological abnormalities in 75 dogs with malignant lymphomas. *Journal of the American Animal Hospital Association* 22, 235-240
90. MADEWELL, B. R., THEILEN, G. H. (1987) Hematopoietic neoplasms, sarcomas and related conditions. *Veterinary Cancer Medicine*, 2nd edn. Theilen GH, Madewell BR, eds. Philadelphia
91. MAEDA, H., OZAKI, K., HONAGA, S., NARAMA, I. (1993) Hodgkin's-like lymphoma in a dog. *Zentralblatt für Veterinärmedizin A* 40, 200-204

92. MARCONATO, L., BONFANTI, U., STEFANELLO, D., LORENZO, M. R., ROMANELLI, G., COMAZZI, S., ZINI, E. (2008) Cytosine arabinoside in addition to VCAA-based protocols for the treatment of canine lymphoma with bone marrow involvement: does it makes the difference? *Veterinary and Comparative Oncology* 6, 80-89
93. MARCONATO, L., LEO, C., GIRELLI, R., SALVI, S., ABRAMO, F., BETTINI, G., COMAZZI, S., NARDI, P., ALBANESE, F., ZINI, E. (2009) Association between waste management and cancer in companion animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 564-569
94. MASSA, K. L., GILGER, B. C., MILLER, T., L., DAVIDSON, M. G. (2002) Causes of uveitis in dogs: 102 cases (1989-2000). *Veterinary Ophthalmology* 5, 93-98
95. MAZAKI-TOVI, M., BANETH, G., AROCH, I., HARRUS, S., KASS, P. H., BEN-ARI, T., ZUR, G., AIZENBERG, I., BARK, H., LAVY, E. (2002) Canine spirocercosis: clinical, diagnostic, pathologic, and epidemiologic characteristics. *Veterinary Parasitology* 107, 235-250
96. MEALEY, K. L., BENTJEN, S. A., GAY, J. M., HOSICK, H. L. (2003) Dexamethasone treatment of canine, but not human, tumour cell line increases chemoresistance independent of P-glycoprotein and multidrug resistance-related protein expression. *Veterinary and Comparative Oncology* 1, 67-75
97. MERLO, D. F., ROSSI, L., PELLEGRINO, C., CEPPI, M., CARDELLINO, U., CAPURRO, C., RATTO, A., SAMBUCCO, P. L., SESTITO, V., TANARA, G., BOCCHINI, V. (2008) Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22, 976-984
98. MESSINGER, J. S., WINDHAM, W. R., WARD, C. R. (2009) Ionized hypercalcemia in dogs: a retrospective study of 109 cases (1998-2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 514-519
99. MODIANO, J. F., BREEN, M., BURNETT, R. C., PARKER, H. G., INUSAH, S., THOMAS, R., AVERY, P. R., LINDBLAD-TOH, K., OSTRANDER, E. A., CUTTER, G. C., AVERY, A. C. (2005) Distinct B-Cell and T-Cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. *Cancer Research* 65, 5654-5661
100. MOE, L., GAMLEM, H., DAHL, K., GLATTRE, E. (2008) Canine neoplasia – population-based incidence of vascular tumours. *Acta Pathologica, Microbiologica, et immunologica Scandinavica* 116, 63-68

101. MOORE, A. S., OGILVIE, G. K., RUSLANDER, D., RAND, W. S., COTTER, S. M., GETZY, D. M., L'HEUREUX, D. A., DENNIS, R. A. (1994) Evaluation of mitoxantrone for the treatment of lymphoma in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 205, 1903-1905
102. MOORE, A. S., LEVEILLE, C. R., REIMANN, K. A., HSING SHU, ARIAS, I. M. (1995) The expression of p-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance. *Cancer Investigation* 13, 475-479
103. MOORE, A. S., LONDON, C. A., WOOD, C. A., WILLIAMS, L. E., COTTER, S. M., L'HEUREUX, D. A., FRIMBERGER, A.E. (1999) Lomustine (CCNU) for the treatment of resistant lymphoma in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 13, 395-398
104. MOORE, A. S., COTTER, S. M., RAND, W. M., WOOD, C. A., WILLIAMS, L. E., LONDON, C. A., FRIMBERGER, A. E., L'HEUREUX, D. A. (2001) Evaluation of a discontinuous treatment protocol (VELCAP-S) for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 15, 348-354
105. MOORE, A. S. (2016) Treatment of T-cell lymphoma in dogs. *Veterinary Record* 179, 277
106. MYERS, N. C., MOORE, A. S., RAND, W. M., GLIATTO, J., COTTER, S. M. (1997) Evaluation of a multidrug chemotherapy protocol (ACOPA II) in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 11, 333-339
107. NADELLA, M. V. P., KISSEBERTH, W. C., NADELLA, K. S., THUDI, N. K., THAMM, D. H., Mc NIEL, E. A., YILMAZ, A., BORIS-LAWRIE, K., ROSOL, T. J. (2008) NOD/SCID mouse model of canine T-cell lymphoma with humoral hypercalcaemia of malignancy: cytokine gene expression profiling and in vivo bioluminescent imaging. *Veterinary and Comparative Oncology* 6, 39-54
108. NIELSEN, L., ANDREASEN, S. N., ANDERSEN, S. D., KRISTENSEN, A. T. (2010) Malignant histiocytosis and other causes of death in Bernese mountain dogs in Denmark. *Veterinary Record* 166, 199-202
109. NOVOTNY, B. J. (1998) Canine Cancer: an overview. In: *Canine Cancer Hill's Pet Nutrition*, Topeca 1-8
110. OWEN, L. N. (1980) TNM classification of tumors in domestic animals. Geneva Switzerland World Health Organization 46-47
111. ONIONS, D. E. (1984) A prospective survey of familial canine lymphosarcoma.

Journal of the National Cancer Institute 72, 909-912

112. PAGE, R. L., Mc ENTEE, M. C., GEORGE, S. L., WILLIAMS, P. L., HEIDNER, G. L., NOVOTNY, C. A., RIVIERE, J. E., DEWHIRST, M. W., THRALL, D. E. (1993) Pharmacokinetic and phase I evaluation of carboplatin in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 7, 235-240
113. PETERSON, M. (2012) Hyperthyroidism in cats: What's causing this epidemic of thyroid disease and can we prevent it? *Journal of Feline Medicine and Surgery* 14, 804-818
114. PIEK, C. J., RUTTEMAN, G. R., TESKE, E. (1999) Evaluation of the results of a L-asparaginase-based continuous chemotherapy protocol versus a short doxorubicin-based induction chemotherapy protocol in dogs with malignant lymphoma. *The Veterinary Quarterly* 21, 44-49
115. PONCE, F., MAGNOL, J. P., LEDIEU D., MARCHAL, T., TURINELLI, V., CHALVET-MONFRAY, K., FOURNEL-FLORY, C. (2004) Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *The Veterinary Journal* 167, 158-166
116. PONCE, F., MARCHAL, T., MAGNOL, J. P., TURINELLI, V., LEDIEU, D., BONNEFONT, C., PASTOR, M., DELIGNETTE, M. L., FOURNEL-FLEURY, C. (2010) A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Veterinary Pathology* 47, 414-433
117. PRICE, G. S., PAGE, R. L., FISCHER, B. M., LEVINE, J. F., GERIG, T. M. (1991) Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 5, 259-262
118. PRIESTER, W. A. (1967) Canine lymphoma: relative risk in the boxer breed. *Journal of the National Cancer Institute* 39, 833-845
119. PRIESTER, W. A., McKAY, F. W. (1980) The occurrence of tumors in domestic animals. *Journal of the National Cancer Institute Monograph* 54, 1-210
120. RASSNICK, K. M., MAULDIN, G. E., AL-SARRAF, R., MAULDIN, G. N., MOORE, A. S., MOONEY, S. C. (2002) MOPP chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs: a retrospective study of 117 cases (1989-2000). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16, 576-580

121. RASSNICK, K. M., BAILEY, D. B., MALONE, E. K., INTILE, J. L., KISELOW, M. A., FLORY, A. B., BARLOW, L. L., BALKMAN, C. E., BARNARD, S. M., WAITE, A. H. (2010) Comparison between L-CHOP and an L-CHOP protocol with interposed treatments of CCNU and MOPP (L-CHOP-CCNU-MOPP) for lymphoma in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology* 8, 243-253
122. RASSNICK, K. M., BAILEY, D. B., MALONE, E. K., FLORY, A. B., KISELOW, M. A., INTILE, J. L. (2014) Tolerability of lomustine in combination with cyclophosphamide in dogs with lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association* 50, 167-173
123. REBHURN, R. B., KENT, M. S., BORROFKA, S., FRAZIER, S., SKORUPSKI, K., RODRIGUEZ, C. O. (2010) CHOP chemotherapy for the treatment of canine multicentric T-cell lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 9, 38-44
124. ROMAN, E., SMITH, A. G. (2011) Epidemiology of lymphomas. *Histopathology* 58, 4-14
125. ROSENBERG, S. A., BERARD, B. W., BROWN, B. W., BURKE, J., DORFMAN, R. F., GLATSTEIN, E., HOPPE, R. T., SIMON, R., HENRY, K., LENNERT, K., LUKES, R. J., O'CONOR, G., RAPPAPORT, H., BERARD, C. W., HARTSOCK, R., KRÜGER, G., NANBA, K., ROBB-SMITH, R. H. T., SACKS, M., BANFI, A., BLOOMFIELD, C., BONADONNA, G., DELELLIS, R., DE VITA, V. T., FRIZZERA, G., HU, M. S. J., KAPLAN, H. S., RILKE, F., ROSAI, J., RUDDERS, R. A., WARNKE, R. A., ZIEGLER, J. L. (1982) National Cancer Institute sponsored study of classification of non-hodgkins lymphomas. *Cancer* 49, 2112-2135
126. ROSENTHAL, R. C. (1981) Clinical applications of Vinca-alkaloids. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 179, 1084-1086
127. RUSLANDER, D. A., GEBHARD, D. H., TOMPKINS, M. B., GRINDEM, C. B., PAGE, R. L. (1997) Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. *In Vivo* 11, 169-172
128. SABA, C. F., THAMM, D. H., VAIL, D. M. (2007) Combination chemotherapy with L-asparaginase, lomustine, and prednisone for relapsed or refractory canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20, 127-132
129. SATO, M., YAMAZAKI, J., GOTO-KOSHINO, Y., SETOGUCHI, A., TAKAHASHI, M., BABA, K., FUJINO, J., OHNO, K., TSUJIMOTO, H. (2016) Minimal residual disease in

- canine lymphoma: An objective marker to assess tumour cell burden in remission. *The Veterinary Journal* 215, 38-42
130. SAUERBREY, M. L., MULLINS, M. N., BANNINK, E. O., VAN DORP, T. E., KANEENE, J. B., OBRADOVICH, J. E. (2007) Lomustine and prednisone as a first-line treatment for dogs with multicentric lymphoma: 17 cases (2004-2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 230, 1866-1869
 131. SCOTTO, K. W., BIEDLER, J. L. MELERA, P. W. (1986) Amplification and expression of genes associated with multidrug resistance in mammalian cells. *Science* 232, 751-755
 132. SIEDLECKI, C. T., KASS, P. H., JAKUBIAK, M. J., DANK, G., LYONS, J., KENT, M. S. (2006) Evaluation of an actinomycin-D-containing combination chemotherapy protocol with extended maintenance therapy for canine lymphoma. *The Canadian Veterinary Journal* 47, 52-59
 133. SIMON, D., NOLTE, I., EBERLE, N., ABBREDERIS, N., KILLICH, M., HIRSCHBERGER, J. (2006) Treatment of dogs with lymphoma using a 12-week, maintenance-free combination chemotherapy protocol. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20, 948-954
 134. SIMON, D., NARANJO, MORENO, S., HIRSCHBERGER, J., MORITZ, A., KOHN, B., NEUMANN, S., JURINA, K., SCHARVOGEL, S., SCHWEDES, S., REINACHER, M., BEYERBACH, M., NOLTE, I. (2008) Efficacy of a continuous, multiagent chemotherapeutic protocol versus a short-term single-agent protocol in dogs with lymphoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 232, 879-885
 135. SIMON D. (2010) Effektivität und Verträglichkeit von Chemotherapien bei Tumorerkrankungen von Hund und Katze und Untersuchungen zu Zytostatikarückständen in Serum und Urin des Hundes. Habilitation Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover
 136. SKRABEK, P., TURNER, D., SEFTEL, M. (2013) Epidemiology of non-hodgkin lymphoma. *Transfusion and Apheresis Science* 49, 133-138
 137. SMITH, A. N. (2014) The role of neutering in cancer development. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 44, 965-975
 138. SÖZMEN, M., TASCA, S., CARLI, E., DE LORENZI, D., FURLANELLO, T., CALDIN, M. (2005) Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis,

- classification and immunophenotyping of canine lymphomas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17, 323-329
139. SORENMO, K. U., OVERLEY, B., KRICK, E., FERRERA, T., LaBLANC, A., SHOFER, F. (2010) Outcome and toxicity associated with a dose-intensified, maintenance-free CHOP-based chemotherapy protocol in canine lymphoma: 130 cases. *Veterinary and Comparative Oncology* 8, 196-208
 140. SORENMO, K. U., KRICK, E., COUGHLIN, C. M. OVERLEY, B., GREGOR, T. P. VONDERHEIDE, R. H., MASON, N. J. (2011) CD-40 Activated B-cell cancer vaccine improves second clinical remission and survival in privately owned dogs with non-hodgkin's lymphoma. *PLOS One (Public Library of Science)* 6, e24167
 141. SQUIRE, R. A., BUSH, M., MELBY, E. C., NEELEY, L. M., YARBROUGH, B. (1973) Clinical and pathologic study of canine lymphoma: clinical staging, cell classification, and therapy. *Journal of National Cancer Institute* 51, 565-574
 142. SREBERNIK, N., APPLEBY, E. C. (1991) Breed prevalence and sites of hemangioma and hemangiosarcoma in dogs. *Veterinary Record* 129, 408-409
 143. STARKEY, M. P., SCASE, T. J., MELLERSH, C. S., MURPHY, S. (2005) Dogs really are man's best friend-canine genomics has applications in veterinary and human medicine! *Briefing in Functional Genomics and Proteomics* 4, 112-128
 144. STONE, M. S., GOLDSTEIN, M. A., COTTER, S. M. (1991) Comparison of two protocols for the induction of remission in dogs with lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association* 27, 315-321
 145. SUMMERS, J. F., DIESEL, G., ASHER, L., McGREEVY, P. D., COLLINS, L. M. (2010) Inherited defects in pedigree dogs. Part 2: Disorders that are not related to breed standards. *The Veterinary Journal* 183, 39-45
 146. SWANSON, J. F. (1990) Ocular manifestations of systemic disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 20, 849-867
 147. SWERDLOW, S. H., CAMPO, E., HARRIS, N. L., JAFFE, E. S., PILERI, S. A., STEIN, H., THIELE, J., VARDIMAN, J. (2008) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4. Auflage, IARC Press, Lyon.
 148. TESKE, E., RUTTEMAN, G. R., VAN HEERDE, P., MISDORP, W. (1990) Polyethylene glycol-L-asparaginase versus native L-asparaginase in canine non-hodgkin's lymphoma. *European Journal of Cancer* 26, 891-895

149. TESKE, E. (1994a) Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-hodgkin's lymphoma. *The Veterinary Quarterly* 16, 209-219
150. TESKE, E., HEERDE, P., RUTTEMAN, G. R., KURZMAN, I. D., MOORE, P. F., MacEWEN, E. G. (1994b) Prognostic factors in canine non-hodgkin's lymphomas. A prospective study in 138 dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 205, 1722-1728
151. TESKE, E., DE VOS, J. P., EGBERINK, H. F., VOS, J. H. (1994c) Clustering in canine malignant lymphoma. *The Veterinary Quarterly* 16, 134-136
152. TESKE, E., WISMANN, P., MOORE, P. F., VAN HERDE, P. (1994d) Histologic classification and immunphenotyping o canine Non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frenquency of T cell lymphomas with B cell morphology. *Experimental Hematology* 22, 1179-1187
153. TESKE, E. (2013) Hämatopoietische Tumoren. In: *Kleintieronkologie* Hrsg. Kessler, M., Enke Verlag Stuttgart, 32, 493-502
154. THOMAS, R., SMITH, K. C., OSTRANDER, E. A., GALIBERT, F., BREEN, M. (2003) Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probes. *British Journal of Cancer* 89, 1530-1537
155. VAIL, D.M., Kisseberth, W. C., OBRADOVICH, J. E., MOORE, F. M., LONDON, C. A., MacEWEN, E. G., RITTER, M. A. (1996) Assessment of potential doubling time (Tpot), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-hodgkin's lymphoma. *Experimental Hematology* 24, 807-815
156. VAIL, D. M., MacEWEN, E. G., YOUNG, K. (2001) Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In *Small Animal Clinical Oncology*, 3rd ed. Philadelphia, Eds. S. J. Withrow, E. G. MacEwen. Academic Press. 558-590
157. VAIL, D. M., YOUNG, K. M. (2007) Canine lymphoma and lymphoid leukemia. In: Withrow, S. J., VAIL, D. M. (Eds.) *Withrow and MacEwens Small Animal Clinical Oncology* fourth ed. Saunders Elsevier, Saint Louis Missouri, USA 699-733
158. VALERIUS, K. D., OGILVIE, G. K., MALLINCKRODT, C. H., GETZY, D. M. (1997) Doxorubicin alone or in combination with asparaginase, followed by cyclophosphamide, vincristine, and prednisone for treatment of multicentric

- lymphoma in dogs: 121 cases (1987-1995). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210, 512-516
159. VALLI, V. E., VERNAU, W., DE LORIMIER, L. P., GRAHAM, P. S., MOORE, P. F. (2006) Canine indolent nodular lymphoma. *Veterinary Pathology* 43, 241-256
 160. VALLI, V. E., SAN MYINT, M., BARTHEL, A., BIENZLE, D., CASWELL, J., COLBATZKY F., DURHAM, A., EHRHART, E. J., JOHNSON, Y., JONES, C., KIUPEL, M., LABELLE, P., LESTER, S., MILLER, M., MOORE, P., MOROFF, S., ROCCABIANCA, P., RAMOS-VARA, J., ROSS, A., SCASE, T., TVEDTEN, H., VERNAU, W. (2011) Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Veterinary Pathology* 48, 198-211
 161. VALLI, V. E., KASS, P. H., SAN MYINT, M., SCOTT, F. (2013) Canine lymphomas: Association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Veterinary Pathology* 50, 738-748
 162. VAN DER MERWE, L. L., KIRBERGER, R. M., CLIFT, S., WILLIAMS, M., KELLER, N., NAIDOO, V. (2008) *Spirocerca lupi* infections in the dog: a review. *The Veterinary Journal* 176, 294-309
 163. VAN PELT, R. W., CONNER, G. H. (1968) Clinicopathologic survey of malignant lymphoma in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 152, 976-984
 164. VAN VECHTEN, M., HELFAND, S. C., JEGLUM, K. A. (1990) Treatment of relapsed canine lymphoma with doxorubicin and dacarbazine. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 4, 187, 191
 165. VETERINARY CO-OPERATIVE ONCOLOGY GROUP (2004) Veterinary Co-operative Oncology Group – common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0. *Veterinary Comparative Oncology* 2, 194-213
 166. VOEGELI, E., WELLE, M., HAUSER, B., DOLF, G., FLÜCKIGER, M. (2006) Das histiozytäre Sarkom beim Berner Sennenhund in der Schweiz: Eine retrospektive Studie über seine genetische Prädisposition. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 148, 281-288
 167. VON EULER, H., EINARSSON, E., OLSSON, U., LAGERSTEDT, A. S., ERIKSSON, S. (2004) Serum thymidine kinase activity in dogs with malignant lymphoma: a potent

- marker for prognosis and monitoring the disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18, 696-702
168. WALTON, R. M., HENDRICK, M. J. (2001) Feline hodgkin's-like lymphoma: 20 cases (1992-1999). *Veterinary Pathology* 38, 504-511
169. WOBESER, B. K., KIDNEY, B. A., POWERS, B. E., WITHROW, S. J., MAYER, M. N., SPINATO, M. T., ALLEN, A. L. (2007) Diagnoses and clinical outcomes associated with surgically amputated canine digits submitted to multiple veterinary diagnostic laboratories. *Veterinary Pathology* 44, 362-365
170. ZANDVLIET, M., RUTTEMAN, G. R., TESKE, E. (2013) Prednisolone inclusion in a first-line multidrug cytostatic protocol for the treatment of canine lymphoma does not affect therapy results. *The Veterinary Journal* 197, 656-661
171. ZANDVLIET, M., TESKE, E., SCHRICKX, J. A. (2014) Multi-drug resistance in a canine lymphoid cell line due to increased P-glycoprotein expression, a potential model for drug resistant canine lymphoma. *Toxicology in Vitro* 28, 1498-1506
172. ZEMANN, B. I., MOORE, A. S., RAND, W. M., MASON, G., RUSLANDER, D. M., FRIMBERGER, A. E., WOOD, C. A., L'HEUREUX, D. A., GLIATTO, J., COTTER, S. M. (1998) A combination chemotherapy protocol (VELCAP-L) for dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12, 465-470

8 Danksagung

Mein Dank gilt besonders meinem Mentor Herrn Dr. Martin Kessler, der mir das Thema vorgeschlagen und mir von Beginn der ersten Zusammenstellung bis zur Fertigstellung der Dissertation mit viel Herzblut und Engagement zur Seite gestanden hat.

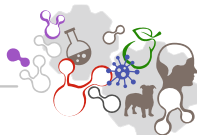
Mein weiterer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Reto Neiger für seine Betreuung und Mithilfe an diesem Projekt. Ein besonderer Dank geht an Frau PD. Dr. Natali Bauer, die uneigennützig die Erstbetreuung des Projekts übernommen hat.

Darüber hinaus geht ein herzlicher Dank an meine Mitstreiter Frau Dr. Theresa Ernst und Frau Dr. Lisanne Willimzig, ohne die diese kumulative Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre und an Frau Dr. Christina Brauer für das mehrfache Korrekturlesen in kürzester Zeit.

Zum Abschluss gilt mein größter Dank meiner Familie, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich in schwierigen Zeiten ertragen, immer wieder aufgebaut und unterstützt haben.

9 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Arbeit, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6647-5



9 783835 196475